

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/00, C12P 7/00		A1	(11) 国際公開番号 WO95/18220
			(43) 国際公開日 1995年7月6日(06.07.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/02220 (22) 国際出願日 1994年12月26日(26.12.94)		横山昭裕(YOKOYAMA, Akihiro)[JP/JP] 〒424 静岡県清水市袖師町1900番 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所 清水研究所内 Shizuoka, (JP)	
(30) 優先権データ 特願平5/348737 1993年12月27日(27.12.93) JP 特願平6/235917 1994年09月05日(05.09.94) JP		(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP)	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP) 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所 (MARINE BIOTECHNOLOGY INSTITUTE CO., LTD.)[JP/JP] 〒113 東京都文京区本郷一丁目28番10号 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, MW, SD, SZ).	
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 三沢典彦(MISAWA, Norihiko)[JP/JP] 近藤恵二(KONDO, Keiji)[JP/JP] 梶原将(KAJIWARA, Susumu)[JP/JP] 〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title : DNA CHAIN USEFUL FOR XANTHOPHYLL SYNTHESIS AND PROCESS FOR PRODUCING XANTHOPHYLLS			
(54) 発明の名称 キサントフィルの合成に有用なDNA鎖およびキサントフィルの製造法			
(57) Abstract <p>The following DNA chains relate to xanthophylls having a keto group, represented by astaxanthin, and the following technique relates to a genetically engineered production of xanthophylls: a DNA chain having a base sequence coding for a polypeptide having an enzymatic activity of converting the 4-methylene group of a β-ionone ring into a keto group; a DNA chain having a base sequence coding for a polypeptide having an enzymatic activity of converting the 4-methylene group of a 3-hydroxy-β-ionone ring into a keto group; a DNA chain having a base sequence coding for a polypeptide having an enzymatic activity of adding a hydroxyl group to the 3-carbon atom of a 4-keto-β-ionone ring; and a process for producing various xanthophylls, such as canthaxanthin and astaxanthin, by introducing the above DNA chain(s) into a suitable microorganism, e.g., <u>Escherichia coli</u>, followed by expression thereof.</p>			

(57) 要約

アスタキサンチンを始めるとするケト基を含むキサン
トフィルに関する下記のようなDNA鎖およびキサント
フィルの遺伝子工学的製造に関する技術が開示されてい
る。

β -イオノン環 (β -ionone ring) の4位のメチレン
(methylene) 基をケト (keto) 基に変換する酵素活性
を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する
DNA鎖。

3-ヒドロキシ- β -イオノン環 (3-hydroxy- β -
ionone ring) の4位のメチレン (methylene) 基をケ
ト (keto) 基に変換する酵素活性を有するポリペプチド
をコードする塩基配列を有するDNA鎖。

4-ケト- β -イオノン環 (4-keto- β -ionone ring)
の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有す
るポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

上記のDNA鎖を適当な微生物、たとえば大腸菌に導入
してこれを発現させることにより、カンタキサンチン、
アスタキサンチンなど種々のキサントイルを製造するこ
とができる。

情報としての用途のみ
PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	シリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スードン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	ベルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SK	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スウェーデン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チアード
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TI	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	イスランド	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴー	IT	イタリー	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PL	ポーランド	VN	ヴィエトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		

明 細 書

キサントフィルの合成に有用なDNA鎖および
キサントフィルの製造法技術分野

本発明は、タイ、サケ、エビ等の養殖魚介類の色揚げに有用であり、また、着色料や抗酸化剤として食品に利用されるアスタキサンチン等のケト基を含むキサントフィル(ケトカロチノイド)の合成に有用なDNA鎖、及び、このDNA鎖を導入した微生物を利用したアスタキサンチン等のケト基を含むキサントフィル(ケトカロチノイド)の製造法に関するものである。

背景技術

キサントフィル(xanthophyll)とは、水酸基、ケト基、エポキシ基などの酸素を含むカロチノイド(carotenooid)色素の総称である。カロチノイドは、メバロン酸を出発物質として、ステロイドやテルペノイドと途中まで共通なイソプレノイド生合成経路によって合成される。イソプレン基本生合成系によって生じたC15のファルネシルピロリン酸(PPP)は、C5のイソペンテニルピロリン酸(IPP)と縮合することにより、C20のゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)が作られる。次に、2分子のGGPPが縮合して、最初のカロチノイドである無色のフィ

トエン (phytoene) が合成される。フィトエンは、一連の不飽和反応により、フィトフルエン (phytofluene) 、 δ -カロチン (δ -carotene) 、ノイロスピレン (neurosporene) 、リコピン (lycopene) に変換され、さらに、このリコピンは環化反応により β -カロチン (β -carotene) に変換される。そして、 β -カロチンに水酸基やケト基などが導入され、種々のキサントフィルが合成されると考えられている (Britton, G., 'Biosynthesis of carotenoids'. Plant Pigments. London, Academic Press, 1988, p. 133-182. (Goodwin, T. W. ed.) 参照)。

最近、発明者らは、植物常在非光合成細菌 Erwinia uredovora のカロチノイド生合成遺伝子群を、その黄色の色調を指標に大腸菌にクローニングし、これらの遺伝子のいろいろな組み合わせを大腸菌等の微生物で発現させることにより、大腸菌等の微生物に、フィトエン、リコピン、 β -カロチン、および、 β -カロチンに水酸基が導入された黄色のキサントフィルであるゼアキサンチンを生産させることを可能にした (図 10 参照) (Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Iizawa, Y., Nakamura, K., Harashima K., 'Elucidation of the Erwinia uredovora carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in Escherichia coli'. J. Bacteriol., 172

, p. 6704-6712, 1990、及び、Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., 'Production of β -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora', Appl. Environ. Microbiol., 57, p. 1847-1849, 1991、及び、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報（特願平2-53255号明細書）：「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」参照）。

一方、赤色のキサントフィルであるアスタキサンチンは、特に海洋生物のタイ、サケ等の赤色魚類や、カニ、エビ等の甲殻類に広く存在する代表的動物カロチノイドである。一般に、動物はカロチノイドを生合成することができないので、微生物や植物によって合成されたカロチノイドを外界より摂取する必要がある。そのため、従来より、タイ、サケ、エビ等の養殖魚介類の色揚げの目的にアスタキサンチンは広く用いられてきた。また、アスタキサンチンは、食品においても、着色料としてだけではなく、癌の原因となる生体内で発生する活性酸素を除去する抗酸化剤としても注目を集めている（松野隆男、幹渉、「動物におけるカロテノイドの生理機能と生物活性」化学と生物、28, p. 219-227, 1990 参照）。アスタキサンチンの供給源としては、南極オキアミ等の甲殻類、酵母 Phaffia の培養物、緑藻 Haematococcus の培養物、及び、有機合成法が知られている。しかし、南極オ

キアミ等の甲殻類を用いる場合、その採取、抽出において、脂質を始めとする夾雜物との分離等において多大な労力とコストを有する。また、酵母 Phaffia の培養物においては、その細胞壁が強固でしかも生産量が低いため、アスタキサンチンの採取、抽出に多大なコストを有する。緑藻 Haematococcus の培養物においては、その培養時には、アスタキサンチン合成に欠くことのできない光を供給しなければならず、太陽光採取のための立地条件や人工光供給のための培養装置等の設備が必要であるだけなく、混在する副生産物の脂肪酸エステルや混在するクロロフィルとの分離が困難である。以上のことから上記の生物起源のアスタキサンチンは、コスト的に、有機合成法に勝てないのが現状であった。しかしながら、有機合成法においては、アスタキサンチンが魚介類の飼料や食品添加剤として用いられることを考慮すると、反応時に生ずる副生成物等の面で問題が残り、また、消費者の天然物嗜好にも反している。以上のことより、安全で消費者イメージのよい生物起源の安価なアスタキサンチンの供給、製造法の開発が望まれている。

発明の開示

もし、アスタキサンチンの生合成を担う遺伝子群があれば非常に有用であると考えられる。なぜなら、アスタキサンチンの產生能の有無にかかわりなく、食品としての安全性やアスタキサンチンの潜在的生産能の面で最適

な微生物に、アスタキサンチン合成遺伝子群を導入することにより、その生産能を与えることができるからである。この場合、混在する副生産物の問題もなく、今日の進んだ遺伝子操作の手法をもって、有機合成法を凌駕するレベルまでアスタキサンチンの生産量を上げることも難しくないと思われる。しかしながら、キサントフィルの1種であるゼアキサンチンまでを合成する遺伝子群は、前述した様にすでに本発明者等によって取得されているが、アスタキサンチンを合成するのに必要なケト基導入酵素をコードする遺伝子等の取得は未だ誰も成功に至ってはいない。この原因としては、ケト基導入酵素は膜タンパク質であり、膜から分離すると活性を失うため、その酵素精製、活性測定が不可能であり、酵素の知見が皆無であったことが挙げられる。したがって、今日まで、アスタキサンチンを遺伝子操作により微生物等に生産させることは不可能であった。

本発明は、アスタキサンチンを始めとするケト基を含むキサントフィル（ケトカロチノイド）を生産するのに必要なケト基導入酵素をコードする遺伝子等を取得することにより、微生物にアスタキサンチンを始めとするケト基を含むキサントフィル（ケトカロチノイド）を生産させるのに必要な遺伝子群を含むDNA鎖、および、このDNA鎖を導入した微生物を利用した、アスタキサンチンを始めとするケト基を含むキサントフィル（ケトカロチ

ノイド) の製造法を提供することを目的とするものである。

通常よく使われる遺伝子クローニング法である、目的とするタンパク質の精製、アミノ酸配列の一部決定、および、合成プローブによる遺伝子の取得法は、アスタキサンチン合成酵素の精製が不可能であることより採用できないことは前述したとおりである。そこで、本発明者等は、非光合成細菌エルビニア (Erwinia) のカロチノイド合成遺伝子群が大腸菌で機能することに注目し、その遺伝子群の組み合わせによって、アスタキサンチンの生合成中間体であると考えられるリコピンや β -カロチンを大腸菌で作らせ、これらの大腸菌をアスタキサンチン合成遺伝子のクローニングのための宿主とした。本発明者等は、また、いくつかの海洋細菌がアスタキサンチンを生産できること (Yokoyama, A., Izumida, H., Mikii, W., 'Marine bacteria produced astaxanthin', 10th International symposium on carotenoids, abstract, CL11-3, 1993)、および、細菌の場合は一連の関連遺伝子がクラスター(群)を構成しているかもしれないこと、および、細菌の場合は大腸菌でその遺伝子群が機能発現するかもしれないことに注目し、この海洋細菌を遺伝子源として選んだ。これら2つの手段を組み合わせて研究を行うことにより、海洋細菌よりアスタキサンチンやその他のケト基を含むキサントフィルの生合成に必要

な遺伝子群の取得に成功し、本発明を完成させるに至った。なお、海洋細菌でアスタキサンチン合成遺伝子群がクラスターを構成しており、大腸菌で機能発現すること、および、これらの遺伝子産物が β -カロチンまたはリコピンを基質として利用できることは、本発明において始めて明かにされたのである。

本発明によるDNA鎖は下記に示すものである。

(1) β -イオノン環 (β -ionone ring) の4位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(2) β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(3) 上記(2)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(2)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(4) β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(5) 上記(4)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(4)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(6) β -カロチンをエキネノンを経てカンタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(7) 上記(6)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(6)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(8) β -カロチンをエキネノンを経てカンタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(9) 上記(8)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(8)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(10) 3-ヒドロキシ- β -イオノン環(3-hydroxy- β -ionone ring)の4位のメチレン(methylene)基をケト(keto)基に変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(11) 3-ヒドロキシ- β -イオノン環の4位のメチ

レン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(12) 上記(11)記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(11)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(13) 3-ヒドロキシ- β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(14) 上記(13)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(13)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(15) ゼアキサンチンを4-ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(16) 上記(15)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(15)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(17) ゼアキサンチンを4-ケトゼアキサンチンを経

てアスタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(18) 上記(17)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(17)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(19) 4-ケト- β -イオノン環(4-keto- β -ionone ring)の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(20) 4-ケト- β -イオノン環の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号2に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(21) 上記(20)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(20)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(22) 4-ケト- β -イオノン環の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号6に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(23) 上記(22)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(22)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(24) カンタキサンチンをフェニコキサンチンを経てアスタキサンチンに転換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号2に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(25) 上記(24)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(24)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(26) カンタキサンチンをフェニコキサンチンを経てアスタキサンチンに転換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号6に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

(27) 上記(26)に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ上記(26)に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

本発明は、また、キサントフィルの製造法にも関する。すなわち、本発明によるキサントフィルの製造法は下記に示すものである。

(1) 上記(1)～(9)のいずれか1項に記載のDNA鎖を、 β -カロチンを産生する能力を有する微生物に

導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物からカンタキサンチンまたはエキネノンを採取することを特徴とする、キサントフィルの製造法。

(2) 上記(10)～(18)のいずれか1項に記載のDNA鎖を、ゼアキサンチンを產生する能力を有する微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物からアスタキサンチンまたは4-ケトゼアキサンチンを採取することを特徴とする、キサントフィルの製造法。

(3) 上記(19)～(21)のいずれか1項に記載のDNA鎖を、カンタキサンチンを產生する能力を有する微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物からアスタキサンチンまたはフェニコキサンチンを採取することを特徴とする、キサントフィルの製造法。

(4) 微生物が細菌または酵母である、上記(1)～(3)のいずれか1項に記載の製造法。

図面の簡単な説明

第1図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 のケト基導入酵素遺伝子 (crtW 遺伝子) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す説明図である。

第2図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 の水酸基導入酵素遺伝子 (crtZ 遺伝子) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す説明図である。

第3図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 のリコピン環化酵素遺伝子 (crtY 遺伝子) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す説明図である。

第4図は、第3図に続く配列を示す説明図である。

第5図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 のキサントフィル合成遺伝子群の塩基配列を示す説明図である。

図中のAからFは、第1図から第4図のAからFに対応している。

第6図は、第5図に続く配列を示す説明図である。

第7図は、第6図に続く配列を示す説明図である。

第8図は、第7図に続く配列を示す説明図である。

第9図は、第8図に続く配列を示す説明図である。

第10図は、非光合成細菌 Erwinia uredovora のカロチノイド生合成経路とカロチノイド合成遺伝子の機能を示す説明図である。

第11図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 および Alcaligenes sp. 10-1 の主要なキサントフィル生合成経路とキサントフィル合成遺伝子の機能を示す説明図である。

ただし、crtY遺伝子の機能は前者においてのみ確認。

第12図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 のキサントフィル合成遺伝子（群）を含む

いろいろなデレーションプラスミドを示す説明図である。

白抜きのPは、ベクター pBluescript II SK の lac のプロモーターを示している。制限酵素切断部位は次のように省略して示されている。S_a, SacI; X, XbaI; B, BamH I; P, PstI; E, EcoRI; S, SalI; A, ApaI; K, KpnI; S_t, StuI; N, NruI; B_g, BglII; N_c, NcoI; H_c, HincII.

第13図は、海洋細菌 Alcaligenes sp. PC-1 のケト基導入酵素遺伝子 (crtW 遺伝子) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す説明図である。

第14図は、第13図に続く配列を示す説明図である。

第15図は、海洋細菌 Alcaligenes sp. PC-1 の水酸基導入酵素遺伝子 (crtZ 遺伝子) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す説明図である。

第16図は、海洋細菌 Alcaligenes sp. PC-1 のキサントフィル合成遺伝子群の塩基配列を示す説明図である。

図中のAからDは、図13～図15のAからDに対応している。

第17図は、第16図に続く配列を示す説明図である。

第18図は、第17図に続く配列を示す説明図である。

第19図は、海洋細菌 Alcaligenes sp. PC-1 のキサントフィル合成遺伝子(群)を含むいろいろなデレーションプラスミドを示す説明図である。

白抜きのPは、ベクター pBluescript II SK+ の lac のプロモーターを示している。

第20図は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 および Alcaligenes sp. PC-1 のマイナーな生合成経路を含むキサントフィル生合成経路とキサントフィル合成遺伝子の機能を示す説明図である。

マイナーな生合計経路は点線の矢印で示されている。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、海洋細菌であるアグロバクテリウム Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 および Alcaligenes sp. PC-1 に由来するアスタキサンチン等のケト基を含むキサントフィル(ケトカルチノイド)の合成に有用なDNA鎖、及び、このDNA鎖を導入した微生物を利用したアスタキサンチン等のケト基を含むキサントフィル(ケトカルチノイド)、すなわち、アスタキサンチン、フェニコキサンチン、4-ケトゼアキサンチン、カンタキサンチン、及び、エキネノンの製造法を提供するものである。

本発明によるDNA鎖は、ファインケミカル生成反応の点から原理、原則的には、前記(1)、(10)および(19)により示され、基本的には、前記(2)、(4)、(11)、(13)、(20)および(22)により定義されるものである。DNA鎖(2)および(4)の具体例が前記(6)および(8)であり、DNA鎖(11)および(13)の具体例が前記(15)および(17)であり、さらに、DNA鎖(20)および(22)の具体例が前記(24)および

(26) である。なお、DNA鎖(3)、(5)、(7)、(9)、(12)、(14)、(16)、(18)、(21)、(23)、(25)および(27)は、それぞれ、DNA鎖(2)、(4)、(6)、(8)、(11)、(13)、(15)、(17)、(20)、(22)、(24)および(26)に対して、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするものである。

本発明によるDNA鎖がコードするポリペプチドは、アミノ酸配列が実質的に配列番号1～2及び5～6(第1～2図及び第13～15図)における前記したような特定範囲(たとえば配列番号1(第1図)ではアミノ酸番号1～212の配列であるアミノ酸配列(第1図ではA～B))を有するものである。本発明において、これらのDNA鎖によってコードされる4種のポリペプチド(すなわちキサントフィル生成反応に関与する4種の酵素)は、前述のような酵素活性を有する限りアミノ酸のいくつかについて欠失、置換、付加等の変化があってもよい(実施例13参照)。このことは、「アミノ酸配列が実質的に---」ということと対応している。たとえば、この酵素の第1番目のアミノ酸(Met)が欠失しているものなどもこのアミノ酸配列の変化によるポリペプチドないしは酵素に包含される。なお、各ポリペプチドをコードする本発明DNA鎖は、配列番号1～2及び5～6(第1～2図及び第13～15図)に示した特定範囲の塩基配列

をもつものの他に、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体をも包含するものであることはいうまでもない。

ケト基導入酵素遺伝子 (crtW)

DNA鎖(1)～(18)はケト基導入酵素をコードする遺伝子(crtWと命名)である。この典型的な例は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 または Alcaligenes sp. PC-1 よりクローニングした crtW 遺伝子であり、第1図の A から B (配列番号 1 のアミノ酸番号 1～212) または第13～14図の A から B (配列番号 5 のアミノ酸番号 1～242) までのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなるDNA鎖である。crtW 遺伝子産物(以下 CrtWとも呼ぶ)は、 β -イオノン環(β -ionone ring)の4位のメチレン(methylene)基をケト(keto)基に転換する酵素活性を有しており、その具体的な例の1つが、 β -カロチン(β -carotene)を基質としてエキネノン(echinenone)を経てカンタキサンチン(canthaxanthin)を合成する酵素活性である(第11図参照)。さらに、crtW遺伝子産物は、3-ヒドロキシ- β -イオノン環(3-hydroxy- β -ionone ring)の4位のメチレン(methylene)基をケト(keto)基に転換する酵素活性も有しており、その具体的な例の1つが、ゼアキサンチン(zeaxanthin)を基質として4-ケトゼアキサンチン(4-ke

tozeaxanthin) を経てアスタキサンチン (*astaxanthin*) を合成する酵素活性である (第 11 図参照)。なお、このような酵素活性を有するポリペプチドおよびこれをコードする DNA 鎖は、従来知られていなかったものであり、このポリペプチドまたはこれをコードする DNA 鎖は、現在までに知られているどのようなポリペプチドまたは DNA 鎖とも全体的なホモロジーは有していない。また、 β -イオノン環や 3-ヒドロキシ- β -イオノン環に限らず、1 つの酵素がジハイドロカルボニル基を直接ケト基に変換するという知見は今まで無かったものである。なお、*Agrobacterium* と *Alcaligenes* 間の *CrtW* のホモロジーは、アミノ酸配列レベルで、83% のアイデンティティーという高いホモロジーを示した。

一方、非光合成細菌 *Erwinia* のカロチノイド合成遺伝子を用いることにより、大腸菌等の微生物に β -カロチンやゼアキサンチンを作らせることができる、すなわち、*Erwinia* の *crtE*、*crtB*、*crtl*、*crtY* 遺伝子は、大腸菌等の微生物に β -カロチン生産能を与える (*Erwinia* の *crtE*、*crtB*、*crtl*、*crtY*、*crtZ* 遺伝子は、大腸菌等の微生物にゼアキサンチン生産能を与える (第 10 図および前記の WO 91/13078 号公開公報参照)。したがって、*CrtW* の基質は、これら *Erwinia* の *crt* 遺伝子群により供給されるので、上記の *Erwinia* の *crt* 遺伝子群を含む大腸菌等の微生物にさらに *crtW* 遺伝子を導入すると、

β - カロチン産生微生物では、エキネノンを経てカンタキサンチンを、ゼアキサンチン産生微生物では、4 - ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンを生産するようになる。

水酸基導入酵素遺伝子 (crtZ)

DNA 鎖 (19) ~ (27) は水酸基導入酵素をコードする遺伝子 (crtZと命名) である。この典型的な例は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 または Alcaligenes sp. PC-1 よりクローニングした crtZ 遺伝子であり、第 2 図の C から D (配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ~ 162) または第 15 図の C から D (配列番号 6 のアミノ酸番号 1 ~ 162) までのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなる DNA 鎖である。crtZ 遺伝子産物 (以下 CrtZ とも呼ぶ) は、 β - イオノン環 (β -ionone ring) の 3 位の炭素に 1 つの水酸基を付加する酵素活性を有しており、その具体的な例の 1 つが、 β - カロチン (β -carotene) を基質として β - クリプトキサンチン (β -cryptoxanthin) を経てゼアキサンチン (zeaxanthin) を合成する酵素活性である (第 11 図参照)。さらに、crtZ 遺伝子産物は、4 - ケト - β - イオノン環 (4-keto- β -ionone ring) の 3 位の炭素に 1 つの水酸基を付加する酵素活性も有しており、その具体的な例の 1 つが、カンタキサンチン (cantaloxanthin) を基質としてフェニコキサンチン (phoenic)xanthin) を

coxanthin) を経てアスタキサンチン (astaxanthin) を合成する酵素活性である (第 11 図参照) 。なお、後者の酵素活性を有するポリペプチドおよびこれをコードする DNA 鎖は、従来知られていなかったものである。また、 Agrobacterium および Alcaligenes の CrtZ は、アミノ酸配列レベルで、 Erwinia uredovora の CrtZ とそれぞれ、 57% および 58 % のアイデンティティーという高いホモロジーを有した。なお、 Agrobacterium と Alcaligenes 間の CrtZ のホモロジーは、アミノ酸配列レベルで、 90% のアイデンティティーという高いホモロジーを示した。

非光合成細菌 Erwinia のカロチノイド合成遺伝子を用いることにより、大腸菌等の微生物に β - カロチンを作らせることができるのは前述のとおりである。さらに、これに crtW を加えると、大腸菌等の微生物にカンタキサンチンを作らせることができるものも前述のとおりである。したがって、 Agrobacterium または Alcaligenes の CrtZ の基質は、 Erwinia の crtE、 crtB、 crtI、 crtY 遺伝子 (β - カロチンの生産) 、および、これらに Agrobacterium または Alcaligenes の crtW 遺伝子を加えたもの (カンタキサンチンの生産) により供給されるので、これらの crt 遺伝子群を含む大腸菌等の微生物に Agrobacterium または Alcaligenes の CrtZ 遺伝子を導入すると、 β - カロチン產生微生物では、 β - クリプトキ

サンチンを経てゼアキサンチンを、カンタキサンチン産生微生物では、フェニコキサンチンを経てアスタキサンチンを生産するようになる。

リコピン環化酵素遺伝子 (crtY)

アミノ酸配列が実質的に第3および4図のEからF（配列番号3のアミノ酸番号1～386）までのアミノ酸配列をコードするDNA鎖は、リコピン環化酵素をコードする遺伝子（crtYと命名）である。この典型的な例は、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 よりクローニングしたcrtY遺伝子であり、第3および4図のEからFまでのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなるDNA鎖である。crtY遺伝子産物（以下 CrtY とも呼ぶ）は、リコピン（lycopene）を基質として β -カロチン（ β -carotene）を合成する酵素活性を有している（第11図参照）。非光合成細菌 Erwinia のカロチノイド合成遺伝子を用いることにより、大腸菌等の微生物にリコピンを作らせることができ、すなわち、Erwinia のcrtE、crtB、crtI 遺伝子は、大腸菌等の微生物にリコピン生産能を与える（第10図および前記の W091/13078号公開公報参照）。したがって、Agrobacterium のCrtY の基質は、Erwinia のcrt 遺伝子群により供給されるので、上記のErwinia のcrt 遺伝子群を含む大腸菌等の微生物に Agrobacterium の crtY を導入すると、 β -カロチンを生産させることが可能と

なる。

なお、Agrobacterium の CrtY は、アミノ酸配列レベルで、Erwinia uredovora の CrtY と 44.3% のアイデンティティーという意義深いホモロジーを有しており、酵素の機能も両者で同一である（第 10 図、第 11 図参照）。

。

海洋細菌の菌学的性質

キサントフィル合成遺伝子の取得源となつた海洋細菌である Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 および Alcaligenes sp. PC-1 は、下記のような菌学的性質を示す。

< Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 >

(1) 形態

菌の形・大きさ：桿状、 $0.9 \mu \text{m} \times 1.2 \mu \text{m}$

運動性：あり

鞭毛：周毛あり

細胞の多形成：なし

胞子の形成：なし

グラム染色：陰性

(2) 各培地における生育状況

肉汁寒天平板培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の円形コロニーを形成する。

肉汁寒天斜面培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の帯状に生育する。

肉汁液体培養：培地全体に均一に生育し、橙色を示す。

肉汁ゼラチン穿刺培養：穿刺孔を中心に表面に生育する。

(3) 生理学的性質

硝酸塩の還元：陽性

脱窒反応：陰性

インドールの生成：陰性

クエン酸の利用：陰性

色素の生成：脂溶性の赤橙色色素

ウレアーゼ活性：陰性

オキシダーゼ活性：陽性

カタラーゼ活性：陽性

β -グルコシダーゼ活性（エスクリン分解性）：陽性

β -ガラクトシダーゼ活性：陽性

生育の範囲：pH 5 ~ 9、温度 10 ~ 40°C

酸素に対する態度：好気性

海水耐性：陽性

O-F テスト：酸化

糖類の同化能：

陽性：D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、D-フルクトース、乳糖、麦芽糖、ショ糖、グリコーゲン、N-アセチル-D-グルコサミン

陰性：L-アラビノース、D-マンニトール、イノシロール、L-ラムノース、D-ソルビトール

有機酸の同化能：

陽性：乳酸塩

陰性：クエン酸塩、リンゴ酸塩、グルコン酸塩、カブリン酸塩、コハク酸塩、アジピン酸塩

他の有機物の資化能：

陽性：イノシン、ウリジン、グルコース-1-リン酸、グルコース-6-リン酸

陰性：ゼラチン、L-アルギニン、DNA、カゼイン

< Alcaligenes sp. PC-1 >

(1) 形態

菌の形・大きさ：短桿状、1.4 μ m

運動性：あり

鞭毛：周毛あり

細胞の多形成：なし

胞子の形成：なし

グラム染色：陰性

(2) 各培地における生育状況

肉汁寒天平板培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の円形コロニーを形成する。

肉汁寒天斜面培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の帯状に生育する。

肉汁液体培養：培地全体に均一に生育し、橙色を示す。

肉汁ゼラチン穿刺培養：穿刺孔を中心表面に生育する。

(3) 生理学的性質

色素の生成：脂溶性の赤橙色色素

オキシダーゼ活性：陽性

カタラーゼ活性：陽性

生育の範囲：pH 5 ~ 9、温度 10 ~ 40°C

酸素に対する態度：好気性

海水耐性：陽性

O-F テスト：酸化

ゼラチン分解性：陰性

他の海洋細菌のキサントフィル合成遺伝子群

今までに 16 種の海洋細菌がアスタキサンチン等のケトカロチノイドを合成することが報告されている (Yokoyama, A., Izumida, H., Miki, W., 'Marine bacteria produced astaxanthin', 10th International symposium on carotenoids, abstract, CL11-3, 1993)。前述した海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 または Alcaligenes sp. PC-1 の crt 遺伝子の内のいずれかをプローブとして用いれば、そのホモロジーを利用することによって、他のアスタキサンチン産生海洋細菌から、アスタキサンチンを始めとするケトカロチノイドの生合成を担う遺伝子群を取得することができるはずである。事実、発明者等は、Ag. aurantiacum sp. nov. MK1 の crtW と crtZ を含む DNA 断片をプローブとして、Alcaligenes PC-1 の染色体 DNA から、強くハイブリダイズする DNA 断片として、crtW と crtZ 遺伝子

を取得したのであった（詳細は実施例を参照されたい）。さらに、発明者等は、アスタキサンチンを合成できる残りの14種の海洋細菌の中から Alteromonas SD-402 を選んで、これから染色体DNAを調製し、Ag. aurantiacus sp. nov. MK1 の crtW と crtZ を含むDNA断片をプローブとして、サザン法を行ったところ、予想どおり、このプローブはこの海洋細菌の染色体DNAに由来するバンドともハイブリダイズした。本発明によるDNA鎖は、このような前記DNA鎖(2), (4), (6), (8), (11), (13), (15), (17), (20), (22), (24)および(26)とハイブリダイズするDNA鎖を包含するものである。

DNA鎖の取得

上記の各酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA鎖を取得する一つの手段は、核酸合成の方法に従って、その鎖長の少なくとも一部を化学合成することであるが、結合アミノ酸が多数であるということを考えれば、この化学合成法よりも Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 または Alcaligenes sp. PC-1 のトータルDNAを適当な制限酵素で消化したものを用いて大腸菌でライブラリーを作製し、このライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、たとえば適当なプローブによるハイブリダイゼーション法、により、これを取得するほうが好ましいと言える（他の海洋細菌の

キサントフィル合成遺伝子群参照)。

大腸菌等の微生物の形質転換および遺伝子発現

上述のような本発明DNA鎖を適当な細菌(例えば、大腸菌、Zymomonas mobilis、Agrobacterium tumefaciens)や酵母(例えばSaccharomyces cerevisiae)等の微生物に導入することにより、種々のキサントフィルを製造することができる。

以下は、好ましい微生物への外来遺伝子の導入法の概要について記載したものである。

大腸菌等の微生物への外来遺伝子の導入および発現のための手順ないし方法は、本発明において下記したところ以外のものにおいても、遺伝子工学の分野により慣用されているものを含み、その手法ないし方法(たとえば、'Vectors for cloning genes', Methods in Enzymology, 216, p. 469-631, 1992, Academic Press、および、'Other bacterial systems', Methods in Enzymology, 204, p. 305-636, 1991, Academic Press 参照)に準じて実施すればよい。

<大腸菌>

大腸菌への外来遺伝子の導入法は、ハナハンの方法、ルビジウム法などすでに確立されたいくつかの効率的方法があり、それを用いて行えばよい(たとえば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 'Molecular cloning -A laboratory manual.' Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 1989 参照)。大腸菌での外来遺伝子の発現は常法に従って行えばよいが(たとえば、前述の 'Molecular cloning -A laboratory manual.' 参照)、たとえば、pUC 系や pBluescript 系等の lac のプロモーター等を有する大腸菌用ベクターを用いて行うことができる。発明者等は、lac のプロモーター等を有する大腸菌用ベクター pBluescript II SK または KS を用いて、lac のプロモーターの転写のリードスルーパーを受ける方向に、Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 の crtW、crtZ、crtY 遺伝子および Alcaligenes sp. PC-1 の crtW、crtZ 遺伝子を挿入し、これらの遺伝子を大腸菌で発現させた。

< 酵母 >

酵母 Saccharomyces cerevisiae への外来遺伝子の導入法は、リチウム法などすでに確立された方法があり、それを用いて行えばよい(たとえば、秋山裕一監修バイオインダストリー協会編集、「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター 刊参照)。酵母での外来遺伝子の発現は、PGK や GPD 等のプロモーターおよびターミネーターを用いて、外来遺伝子をこのプロモーターとターミネーターの間に転写のリードスルーパーを受けるように挿入した発現カセットを構築し、この発現カセットを、S. cerevisiae のベクター、たとえば、YRp 系(酵母染色体の ARS 配列を複製起点とする酵母用マルチ

コピーベクター)、YEp系(酵母の2 μ mDNAの複製起点を持つ酵母用マルチコピーベクター)、YIp系(酵母の複製起点を持たない酵母染色体組込み用ベクター)等のベクターに挿入することにより行うことができる

(前述の「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター刊、日本農芸化学会ABCシリーズ「物質生産のための遺伝子工学」朝倉書店刊、および、Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., 'Metabolic engineering for production of β -carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*'. Biosci. Biotech. Biochem., 58, P. 1112-1114, 1994 参照)。

< Zymomonas mobilis >

エタノール生産細菌 Zymomonas mobilis への外来遺伝子の導入法は、グラム陰性菌に共通な接合伝達法により行うことができ、Zymomonas mobilis での外来遺伝子の発現は、たとえば Zymomonas mobilis 用ベクター pZ A22 を用いて行うことができる(中村克己、「Zymomonas 細菌の分子育種」、日本農芸化学会誌, 63, p. 1016-1018, 1989、および、Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., 'Production of β -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora'. Appl. Environ. Microbiol., 57, p. 1847-1849, 199

1 参照)。

< Agrobacterium tumefaciens >

植物病原細菌 Agrobacterium tumefaciens への外来遺伝子の導入法は、グラム陰性菌に共通な接合伝達法により行うことができ、Agrobacterium tumefaciens での外来遺伝子の発現は、たとえば Agrobacterium tumefaciens 用ベクター pBI121を用いて行うことができる (Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., 'Production of β -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora', Appl. Environ. Microbiol., 57, p. 1847-1849, 1991 参照)。

微生物によるキサントフィル生産

前述した、微生物への外来遺伝子の導入および発現のための手法ないし方法によって、海洋細菌由来のアスタキサンチンを始めとするケトカロチノイド合成遺伝子群を導入し、発現させることが可能である。

ファルネシルピロリン酸 (FPP) はカロチノイドだけでなく、セスキテルペン、トリテルペン、ステロール、ホパノール等のテルペノイドと共通な基質である。一般に、微生物は、カロチノイドを合成できないものでも、テルペノイドは合成しているので、すべての微生物は、基本的に、中間代謝産物として FPPを有しているはずである。一方、非光合成細菌 Erwinia のカロチノイド合成

遺伝子群は、PPPを基質として、Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 または Alcaligenes sp. PC-1 の crt 遺伝子産物の基質、すなわち、リコピン、 β -カロチン、ゼアキサンチンまで合成させることが可能である（第10図参照）。発明者等は、大腸菌だけでなく前記した微生物、すなわち、酵母 Saccharomyces cerevisiae、エタノール生産細菌 Zymomonas mobilis、植物病原細菌 Agrobacterium tumefaciens に Erwiniaの crt 遺伝子群を導入し、これらの微生物が、予想どおり、 β -カロチン等のカロチノイドを生産できるようになることを、すでに確認している（Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., 'Metabolic engineering for production of β -carotene and lycopene in Saccharomyces cerevisiae'. Biosci. Biotech. Biochem., 58, p.1112-1114, 1994、Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., 'Production of β -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora'. Appl. Environ. Microbiol., 57, p.1847-1849, 1991、および、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報（特願平2-53255号明細書）：「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」）。

したがって、Erwinia由来のカロチノイド合成遺伝子群と本発明DNA鎖（典型的には、Agrobacterium aurantiacus sp. nov. MK1 または Alcaligenes sp. PC-1 の crt 遺伝子産物の基質、すなわち、リコピン、 β -カロチン、ゼアキサンチンまで合成させることが可能である（第10図参照）。

iacus sp. nov. MK1 または Alcaligenes sp. PC-1 由来のカロチノイド合成遺伝子群) を組み合わせて同一の微生物に同時に導入することにより、原理的には、遺伝子導入発現系が確立しているすべての微生物に、アスタキサンチン等のケトカロチノイドを生産させることが可能となるはずである。以下に、各種ケトカロチノイドの微生物による生産法について説明する。

＜カンタキサンチン、エキネノンの生産＞

β -カロチン合成に必要な Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子およびケト基導入酵素遺伝子である本発明DNA鎖(1)～(9)のいずれか1項のDNA鎖(典型的には Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 または Alcaligenes PC-1 の crtW 遺伝子)を大腸菌等の微生物に導入し発現させることにより、最終産物としてカンタキサンチン、中間代謝産物としてエキネノンを生産させることができる。上記DNA鎖(crtW 遺伝子)の発現レベルの調節やこれを有する微生物の培養条件の検討等により、カンタキサンチンやエキネノンの収量や量比を変えることができる。以下に大腸菌における2つの例を述べるが、詳細は実施例を参照されたい。

Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター pACYC184 に挿入したプラスミド pACCAR16 Δ crtX、および、Ag. aurantiacum sp. nov. MK1 の crtW 遺伝子を含む断片を大腸菌ベク

ター pBluescript II SK- に挿入したプラスミド pAK91 6 の両プラスミドを大腸菌 JM101 に導入し、それを定常期まで培養し、菌体を集め、カロチノイド色素を抽出した。抽出された色素の 94% はカンタキサンチンであり、6% はエキネノンであった。また、カンタキサンチンの収量は、培養液 2 リットルから 3 mg であった。

Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター pACYC184 に挿入したプラスミド pACCAR16 Δ crtX、および、Alcaligenes PC-1 の crtW 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター pBluescript II SK+ に挿入したプラスミド pPC17-3 の両プラスミドを大腸菌 JM101 に導入し、それを定常期まで培養し、菌体を集め、カロチノイド色素を抽出した。抽出された色素の 40% はカンタキサンチンであり、50% はエキネノンであった。残りの 10% は未反応の β -カロチンであった。

＜アスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチンの生産＞
ゼアキサンチン合成に必要な Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY、crtZ 遺伝子およびケト基導入酵素遺伝子である本発明 DNA 鎖 (10) ~ (18) のいずれか 1 項の DNA 鎖（典型的には Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 または Alcaligenes PC-1 の crtW 遺伝子）を大腸菌等の微生物に導入し発現させることにより、最終産物としてアスタキサンチン、中間代謝産物と

して4-ケトゼアキサンチンを生産させることができる。上記DNA鎖(crtW遺伝子)の発現レベルの調節やこれを有する微生物の培養条件の検討等により、アスタキサンチンや4-ケトゼアキサンチンの収量や量比を変えることができる。ただし、

以下に大腸菌における2つの例を述べるが、詳細は実施例を参照されたい。

Erwinia uredovoraのcrtE、crtB、crtI、crtY、crtZ遺伝子を含む断片を大腸菌ベクターpACYC184に挿入したプラスミドpACCAR25△crtX、および、Ag. aurantiacus sp. nov. MK1のcrtW遺伝子を含む断片を大腸菌ベクターpBluescript II SK-に挿入したプラスミドpAK916の両プラスミドを大腸菌JM101に導入し、それを定常期まで培養し、菌体を集め、カロチノイド色素を抽出した。抽出された色素のうち、アスタキサンチンと4-ケトゼアキサンチンの収量は、それぞれ、培養液2リットルから1.7mg、1.5mgであった。

Erwinia uredovoraのcrtE、crtB、crtI、crtY、crtZ遺伝子を含む断片を大腸菌ベクターpACYC184に挿入したプラスミドpACCAR25△crtX、および、Alcaligenes sp. PC-1のcrtW遺伝子を含む断片を大腸菌ベクターpBluescript II SK+に挿入したプラスミドpPC17-3の両プラスミドを大腸菌JM101に導入し、それを定常期まで培養し、菌体を集め、カロチノイド色素を抽出した。抽

出された色素のうち、アスタキサンチンと4-ケトゼアキサンチンの収量は、それぞれ、培養液2リットルから約1mgであった。

＜アスタキサンチン、フェニコキサンチンの生産＞

β -カロチン合成に必要なErwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子およびケト基導入酵素遺伝子である本発明DNA鎖(1)～(9)のいずれか1項のDNA鎖(典型的にはAgrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1またはAlcaligenes PC-1のcrtW 遺伝子)と水酸基導入酵素遺伝子である本発明DNA鎖(19)～(21)のいずれか1項のDNA鎖(典型的にはAg. aurantiacum sp. nov. MK1またはAlcaligenes PC-1のcrtZ 遺伝子)を大腸菌等の微生物に導入し発現させることにより、最終産物としてアスタキサンチン、中間代謝産物としてフェニコキサンチンを生産させることができる。上記DNA鎖(crtW 遺伝子およびcrtZ 遺伝子)の発現レベルの調節やこれを有する微生物の培養条件の検討等により、アスタキサンチン、フェニコキサンチンの収量や量比を変えることができる。以下に大腸菌における1例を述べるが、詳細は実施例を参照されたい。

Erwinia uredovora の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター pACYC184 に挿入したプラスミド pACCAR16 Δ crtX、および、Ag. aurantiacum sp. nov. MK1 の crtW、crtZ 遺伝子を含む断片を大

腸菌ベクター pBluescript II SK- に挿入したプラスミド pAK96K の両プラスミドを大腸菌 JM101に導入し、それを定常期まで培養し、菌体を集め、カロチノイド色素を抽出した。抽出された色素のうち、アスタキサンチンとフェニコキサンチンの収量は、それぞれ、培養液 4 リットルから 3 mg、2 mg であった。

微生物の寄託

本発明 DNA 鎖の遺伝子源となつた微生物および単離された遺伝子を組み込んだ大腸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所に下記の通りに寄託されている。

(i) Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1

寄託番号 : FERM BP-4506

受託年月日 : 平成 5 年 12 月 20 日

(ii) Escherichia coli JM101 (pAccrt-EIB, pAK92)

寄託番号 : FERM BP-4505

受託年月日 : 平成 5 年 12 月 20 日

(iii) Alcaligenes sp. PC-1

寄託番号 : FERM BP-4760

受託年月日 : 平成 6 年 7 月 27 日

(iv) Escherichia coli. β : pPC17

寄託番号 : FERM BP-4761

受託年月日 : 平成 6 年 7 月 27 日

例

以下の実施例は、本発明をさらに具体的に説明するた

めのものであり、本発明を限定するものではない。なお、ここで用いられた通常の遺伝子組換え実験は、特に言及されていない場合は、標準的な方法 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 'Molecular cloning - A laboratory manual,' Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に基づいている。

実施例 1：染色体DNAの調製

染色体DNAは、3種の海洋細菌、すなわち、Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1、Alcaligenes sp. PC-1、及びAlteromonas SD-402 株 (Yokoyama, A., Izumiya, H., Miki, W., 'Marine bacteria produced astaxanthin'. 10th International symposium on carotenoids, abstract, CL11-3, 1993) から調製した。これらの海洋細菌を 200ミリリットル (ml) の培地 (DIFCO 社製 "Marine Broth" を説明書記載の方法により調製した培地) で、25°C、定常期まで4日間増殖させた菌体を集菌後、TES 緩衝液 (20 mM トリス、10 mM EDTA、0.1 M NaCl、pH8) で洗浄し、68°Cで15分間熱処理した後、5 mg/ml リゾチーム (生化学工業製) と 100 μg/ml RNase A (シグマ社製) を含むI液 (50 mM グルコース、25 mM トリス、10 mM EDTA、pH8) に懸濁した。37°Cで1時間インキュベートした後、250 μg/ml になるようにプロテイナーゼ K (Proteinase K、ベーリングガード・マンハイム製) を加え、37°Cで10分間インキュベー

トした。さらに、最終濃度が 1 % になるようにザルコシール (N-Lauroylsarcosine Na 、シグマ社製) を加え、よく混合した後、37°Cで数時間インキュベートした。さらに、フェノール／クロロホルム抽出を数回行った後、2倍量のエタノールをゆっくり加えながら、析出してきた染色体DNAをガラス棒に巻き付け、70%エタノールでリ nsした後、2 ml の TE 緩衝液 (10 mM トリス、1 mM EDTA 、 pH 8) に溶解して、染色体DNA調製液とした。

実施例 2：コスミドライブラーのための宿主の作製

(1) フィトエン産生大腸菌の作製

Erwinia uredovora の crtZ 以外のカロチノイド合成遺伝子群を有するプラスミド pCAR16 (Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima K., 'Elucidation of the E rwini ia uredovora carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in Escherichia coli', J. Bacteriol., 172, p. 6704-6712, 1990、および、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報 (特願平2-53255号明細書) : 「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」) から Bst EII (1235) - Eco 521 (4926) 断片を除いた後、フィトエン産生に必要な crtE と crtB 遺伝子を含む 2.3 キロ塩基対 (kb) の Asp 718 (Kpn I) - Eco RI 断片を切りだした。そして、この断片を大腸菌ベクター pACYC184 の Eco RV 部

位に挿入し、目的とするプラスミド (pACCRT-EB) を得た。この pACCRT-EB を有する大腸菌は、抗生物質クロラムフェニコール耐性 (Cm^R) を示し、フィトエンを生産する (Linden, H., Misawa, N., Chamovitz, D., Pecker, I., Hirschberg, J., Sandmann, G., 'Functional complementation in Escherichia coli of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenes'. Z. Naturforsch., 46c, 1045-1051, 1991)。

(2) リコピン産生大腸菌の作製

E. uredovora の crt2 以外のカロチノイド合成遺伝子群を有するプラスミド pCAR16 から Bst EII (1235) - Sna BI (3497) 断片を除いた後、リコピン産生に必要な crtE、crtI、crtB 遺伝子を含む 3.75 kb Asp 718 (Kpn I) - Eco RI 断片を切りだした。そして、この断片を大腸菌ベクター pACYC184 の Eco RV 部位に挿入し、目的とするプラスミド (pACCRT-EIB) を得た。この pACCRT-EIB を有する大腸菌は、Cm^R を示し、リコピンを生産する (Cunningham Jr, F. X., Chamovitz, D., Misawa, N., Gatt, E., Hirschberg, J., 'Cloning and functional expression in Escherichia coli of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of β -carotene'. FEBS Lett., 328, 130-138, 1993)。

(3) β -カロチン産生大腸菌の作製

Er. uredovora の crtZ 以外のカロチノイド合成遺伝子群を有するプラスミド pCAR16 の制限酵素 Bst EII 消化、 Klenow fragment 溶液、ライゲーション反応を行うことにより、crtX 遺伝子をフレームシフトにより失活させた後、 β -カロチン産生に必要な crtE、crtY、crtI、crtB 遺伝子を含む 6.0 kb Asp 718 (Kpn I) - Eco RI 断片を切りだした。そして、この断片を大腸菌ベクター pACYC184 の Eco RV 部位に挿入し、目的とするプラスミド (pACCAR16 Δ crtX と命名) を得た。この pACCAR16 Δ crtX を有する大腸菌は、Cm^r を示し、 β -カロチンを生産する。なお、制限酵素および遺伝子操作に用いる酵素類は、宝酒造 (株) またはベーリンガー・マンハイム社から購入した。

実施例 3 : コスミドライブラーの作製および橙色を呈する大腸菌の取得

Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 の染色体 DNA 25 μ g に対して、1 ユニットの制限酵素 Sau 3AI を用い、37°C、15 分間インキュベートした後、68°C、10 分間の処理で制限酵素を失活させた。この条件で、40 kb 付近に多くの Sau 3AI 部分分解断片が得られた。この一部を用いて、コスミドベクター pJB8 (アンピシリン耐性 (Ap^r)) を Bam H I 消化後アルカリフォスファターゼ処理したもの、および、pJB8 を Sall / Bam H I

消化後右アーム（小さい方の断片）をゲルから回収したものを混ぜ、12°C、一晩ライゲーション反応を行った。なお、pJB8 は以前にアマーシャム社から購入したものである。

上記のライゲーション反応を行ったDNAを用い、ギガパック・ゴールド（ストラタジーン社製、フナコシ販売）により in vitro パッケージングを行い、コスミドライブライアリーアを作るので十分量のファージ粒子を得た。

このファージ粒子を大腸菌 (Escherichia coli) DH1 (ATCC33849)、および、実施例2で作製した3種のプラスミドの各々を有する大腸菌 DH1 に感染させた後、1プレートあたり100-300コロニーになるように希釀し、適当な薬剤を含むLB (1%トリプトン、0.5%イーストエキス、1%NaCl) にプレーティングし、37°Cまたは室温で、一晩から数日間培養した。

その結果、ただの大腸菌（ベージュ色）および pACCR-T-E8 を有するフィトエン産生大腸菌（ベージュ色）を宿主としたコスミドライブライアリーアでは、各々、1万コロニー以上スクリーニングしたが、色調が変化したものは得られなかった。一方、pACCR-T-E1B を有するリコピン産生大腸菌（うすい赤色）および pACCAR16 Δ crtXを有するβ-カロチン産生大腸菌（黄色）を宿主としたコスミドライブライアリーアでは、各々、数百コロニーに1株の割合で、橙色を呈するコロニーが出現した。これらの橙色

を呈する大腸菌形質転換株のほとんどは、pJB8 に 40 kb 前後の Sau3AI 部分分解断片が挿入されたプラスミドを含んでいた。なお、ただの大腸菌および pACCRT-EB を有するフィトエン産生大腸菌を宿主としたコスミドライブライアリーでは色調が変化したものは得られなかったことから、Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 染色体DNA からキサントフィル合成遺伝子群を発現クローニングするためには、少なくともフィトエンより後のカロチノイド合成中間体を作る大腸菌を宿主として用いなければならぬことがわかる。

実施例 4：橙色色素合成遺伝子群を含む断片の縮小化

pACCRT-EIB を有するリコピン産生大腸菌 DH1 (うすい赤色) および pACCAR16 Δ crtI を有する β -カロチン産生大腸菌 DH1 (黄色) を宿主としたコスミドライブライアリーで得られた橙色のコロニーの中から、各々、数十コロニーを選んで、そのプラスミドを分析したところ、1 株を除いてすべて、pJB8 に 33 kb から 47 kb の Sau3AI 部分分解断片が挿入されたプラスミドが含まれていた。残りの 1 株 (リコピン産生大腸菌を宿主としたもの) には、pJB8 に 3.9 kb の Sau3AI 部分分解断片が挿入されたプラスミド (pAK9 と命名) が含まれていた。これは、大腸菌に感染後、挿入断片の in vivo デレーションにより形成されたものであると考えられた。pAK9 を有するリコピン産生大腸菌は、その他のコスミドライ

ブラリーから得られた橙色コロニーと同一の色素（実施例6においてアスタキサンチンと同定）を合成することができたので、以後の解析には、このpAK9を材料として用いた。

実施例5：橙色色素合成遺伝子群の塩基配列決定

pAK9から調製した3.9kbのEcoRI挿入断片を大腸菌ベクターpBluescript II SK+のEcoRI部位に挿入して、断片の方向性がベクターに対して互いに逆の2種のプラスミド（pAK91およびpAK92と命名）を得た。このうちプラスミドpAK92の制限酵素地図を第12図に示す。pAK92をリコピン産生大腸菌に導入したところ、アスタキサンチン合成（実施例6）により橙色コロニーになったが、pAK91をリコピン産生大腸菌に導入しても、新たな色素の合成能は与えられなかった。したがって、プラスミドpAK92における色素合成遺伝子群の方向性はベクターのlacプロモーターの向きと同じであると考えられた。つぎにpAK91のPstI分解により得られる2.7kbのPstI断片と、pAK92からBamH I分解により得られる2.9kbのBamH I断片およびSallI分解により得られる2.3kbと1.6kbとのSallI断片とを、それぞれベクターpBluescript II SK-にクローニングした。これにより得られたプラスミドのうち、pAK94、pAK96、pAK98、pAK910、pAK93、pAK95と名付けたプラスミドの制限酵素地図を第12図に示す。プラスミドpAK94、pAK96、pAK98、

pAK910は色素合成遺伝子群の方向性がベクターの lac プロモーターの向きと同じであり、pAK93、pAK95では逆である。

2.9 kbの BamHI 断片を有するプラスミドpAK96をリコピング産生大腸菌に導入しても、3.9 kb EcoRI 断片を有するpAK92を導入した場合と同様に、その大腸菌形質転換株はアスタキサンチンを合成することがわかったため（実施例6）、この2.9 kb BamHI断片のDNA配列の決定を行った。

DNA配列の決定は2.9 kbの BamHI 断片について正逆両方向からの欠失変異体を作成し、得られた種々の長さの欠失を有するクローンについて行った。欠失変異体作製は4種のプラスミドpAK96、pAK98、pAK93、pAK95について以下の手順で行った。それぞれのプラスミド、10 μ gを SacIと XbaIとで分解した後、フェノール／クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿によりDNAを回収した。それぞれのDNAを100 μ lのExoIIIバッファー（50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM 2-メルカプトエタノール, pH 8.0）に溶解し、180 ユニットのExoIIIヌクレアーゼを加えて37°Cで保温した。1分ごとに10 μ lをサンプリングして、2サンプル分ずつ、20 μ lのMBバッファー（40 mM Na-Acetate, 100 mM NaCl, 2 mM ZnCl₂, 10 % グリセロール, pH 4.5）の入った氷上のチューブに移した。サンプリング終了後、得

られた 5 本のチューブを 65°C、10 分間保温して酵素を失活させた後、5 ユニットのマングビーンヌクレアーゼを加えて 37°C で 30 分間保温した。反応後、アガロースゲル電気泳動により、1 つのプラスミドについて 5 種のそれぞれ欠失の程度が異なる DNA 断片を回収した。回収した DNA は Klenow fragment により末端を平滑化し、16°C、一晩ライゲーション反応した後、大腸菌 JM109 を形質転換した。得られた種々のクローンについてヘルパー ファージ M13K07 を用いて 1 本鎖 DNA を調製し、アプライドバイオシステム（株）の蛍光プライマーサイクルシークエンスキットを用いてシークエンス反応を行い、自動シークエンサーを用いて DNA 配列を決定した。

その結果得られた 2886 塩基対 (bp) からなる DNA 配列を第 5 ~ 9 図 (配列番号 4) に示す。開始コドンの前にリボソーム結合部位が存在するオープン・リーディング・フレームの検索の結果、3 種のキサントフィル合成遺伝子 critW、critZ、critY の存在が予想された位置 (実施例 8) に各々のタンパク質をコードしうる 3 つのオープンリーディングフレーム (第 5 ~ 9 図中 A から B (配列番号 4 の塩基位置 229 ~ 864)、C から D (塩基位置 864 ~ 1349)、E から F (塩基位置 1349 ~ 2506)) が見いだされた。このうち A から B、E から F の 2 つのオープンリーディングフレームについてはそれぞれ開始コドンは GTG であり、C から D については ATG である。

実施例 6 : 橙色色素の同定

pAK92 または pAK96 をリコピン産生大腸菌 JM101 に導入したもの（大腸菌（pACCRT-E1B、pAK92 または pAK96））（橙色を呈している）、または、pAK94 または pAK96K（第12図）を β -カロチン産生大腸菌 JM101 に導入したもの（大腸菌（pACCAR16Δ crtX、pAK94 または pAK96K））（橙色を呈している）を 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン（Ap、明治製薬製）と 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコール（Cm、三共製）を含む 2YT 培地（1.6% トリプトン、1% イーストエキス、0.5% NaCl）4 リットルで、37°C、18時間培養した。培養液から集菌した菌体を、600 ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、40 ml のクロロホルム／メタノール（9/1）で2回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを小量のクロロホルム／メタノール（9/1）に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲル TLC プレートを用いて、クロロホルム／メタノール（15/1）で展開することにより、薄層クロマトグラフィー（TLC）を行った。元の橙色色素は、この TLC により、 R_f 値 0.72、0.82、0.91 の3スポットに分かれた。橙色色素全体の 50% に相当する、最も濃い R_f 0.72 の色素と、次に濃い R_f 0.82 の色素を、TLC プレートから、かきとり後、小量のクロロホルム／メタノール（9/1）またはメタノールに溶解し、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー（15 x 300 mm）

にかけ、クロロホルム／メタノール (9 / 1) またはメタノールで展開溶出することにより、各々の純品を、3 mg (: R_f 0.72) 、2 mg (: R_f 0.82) 得た。

R_f 0.72 の色素は、紫外ー可視スペクトル、¹H-NMR、FD-MS スペクトル (m / e 596) の結果より、アスタキサンチンと同一の平面構造を持つものであることが明かになった。そこで、ジエチルエーテル : 2-プロパノール : エタノール 5 : 5 : 2 に溶解し、CDスペクトルを測定したところ、3S, 3'S の立体構造をとることがわかったため、本物質をアスタキサンチン (astaxanthin、構造式は第11図参照) と同定した。また、R_f 0.82 の色素は、紫外ー可視スペクトル、¹H-NMR、FD-MS スペクトル (m / e 580) の結果より、フェニコキサンチン (phoenicocanthin、構造式は第11図参照) と同定された。なお、R_f 0.91 の色素はカンタキサンチンであった (実施例7(2))。

実施例7：キサントフィル中間代謝産物の同定

(1) 4-ケトゼアキサンチンの同定

ゼアキサンチン産生大腸菌は次のようにして作製された。すなわち、*Er. uredovora* の全カロチノイド合成遺伝子群を有するプラスミド pCAR25 (Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima K., 'Elucidation of the *E. uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by

y functional analysis of gene products expressed in Escherichia coli'. J. Bacteriol., 172, p. 6704-6712, 1990、および、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報（特願平2-53255号明細書）：「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」）の制限酵素Bst E II消化、Klenow fragment処理、ライゲーション反応を行うことにより、crtX遺伝子をフレームシフトにより失活させた後、ゼアキサンチン産生に必要なcrtE、crtY、crtI、crtB、crtZ遺伝子を含む6.5 kb Asp 718（Kpn I）-Eco RI断片を切りだした。そして、この断片を大腸菌ベクターpACYC184のEco RV部位に挿入し、目的とするプラスミド（pACCAR25ΔcrtXと命名）を得た。

pAK910またはpAK916（第12図）をこのゼアキサンチン産生大腸菌JM101に導入したもの（大腸菌（pACCAR25ΔcrtX、pAK910またはpAK916））（橙色を呈している）を150 μg/mlのApと30 μg/mlのCmを含む2YT培地2リットルで、37°C、18時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300 mlのアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 mlのクロロホルム/メタノール（9/1）で2回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを小量のクロロホルム/メタノール（9/1）に溶解後、マルク社製の分取用シリカゲルTLCプレートを用いて、クロロホルム/メタノール（15/1）で展開することにより、薄層クロマトグラフィー（TLC）を行った。元の橙

色色素は、このTLCにより、 R_f 値 0.54 (46%)、0.72 (53%)、0.91 (1%) の3スポットに分かれた。 R_f 0.54 の色素を、TLCプレートから、かきとり後、小量のクロロホルム/メタノール (9/1) またはメタノールに溶解し、セファデクスLH-20カラムクロマトグラフィー (15 X 300 mm) にかけ、クロロホルム/メタノール (9/1) またはメタノールで展開溶出することにより、純品を 1.5 mg 得た。

本物質における紫外-可視スペクトル、FD-MSスペクトル (m/e 582)、および、シリカゲルTLCの移動度 (クロロホルム/メタノール (15/1) で展開) が、4-ケトゼアキサンチンの標準品 (Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 より精製、特願平5-70335) とすべて一致したため、本物質を4-ケトゼアキサンチン (4-ketozeaxanthin、構造式は第11図参照) と同定した。なお、 R_f 0.72 および R_f 0.91 の色素はそれぞれ、アスタキサンチン (実施例6)、カンタキサンチン (実施例7(2)) である。

(2) カンタキサンチンの同定

pAK910またはpAK916を β -カロチン産生大腸菌JM101に導入したもの (大腸菌 (pACCAR16Δ crtX、pAK910またはpAK916)) (橙色を呈している) を 150 μ g / ml のApと 30 μ g / ml のCmを含む2YT培地2リットルで、37°C、18時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300

ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 ml のクロロホルム/メタノール (9/1) で2回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを小量のクロロホルム/メタノール (9/1) に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲル TLC プレートを用いて、クロロホルム/メタノール (50/1) で展開することにより、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。橙色色素全体の94%に相当する最も濃い色素を、TLC プレートから、ときとった。さらに小量のクロロホルム/メタノール (9/1) またはクロロホルム/メタノール (1/1) に溶解後、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー (15 X 300 mm) にかけ、クロロホルム/メタノール (9/1) またはクロロホルム/メタノール (1/1) で展開溶出することにより、純品を 3 mg 得た。

本物質における紫外-可視スペクトル、¹H-NMR、FD-MS スペクトル (m/e 564) 、および、シリカゲル TLC の移動度 (クロロホルム/メタノール (50/1) での展開で Rf 0.53) が、カンタキサンチンの標準品 (BASF社製) とすべて一致したため、本物質をカンタキサンチン (catharanthine、構造式は第11図参照) と同定した。また、最初の抽出物に見られた橙色色素全体の 6% に相当する色素は、紫外-可視スペクトル、シリカゲル TLC の移動度 (クロロホルム/メタノール (50/1) での展開で Rf 0.78) 、および、ノバパック HR 6 μ C18 (3.9 X 30

0 mM) (ウォーターズ社製) を用いたHPLCの移動度 (アセトニトリル/メタノール/2-プロパノール (90/6/4) で 1.0 ml/min の速度での展開で RT 16分) よりエキネノン (echinenone、構造式は第11図参照) であると考えられた。

(3) ゼアキサンチンの同定

pAK96NK (第12図) を β -カロチン産生大腸菌JM101に導入したもの (大腸菌 (pACCAR16Δ crtX、pAK96NK)) (黄色を呈している) を 150 μ g/mlのApと 30 μ g/mlのCmを含むYT 培地 2 リットルで、37°C、18時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300 ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 ml のクロロホルム/メタノール (9/1) で2回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを小量のクロロホルム/メタノール (9/1) に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲル TLC プレートを用いて、クロロホルム/メタノール (9/1) で展開することにより、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。黄色色素全体の 81% に相当する最も濃い色素を、TLC プレートから、かきとった。さらに小量のクロロホルム/メタノール (9/1) またはメタノールに溶解後、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー (15 x 300 mM) にかけ、クロロホルム/メタノール (9/1) またはメタノールで展開溶出することにより、純品を 3 mg 得た。

本物質における紫外-可視スペクトル、 $^1\text{H-NMR}$ 、 FD-MS スペクトル ($\text{m} / \epsilon 568$)、および、シリカゲルTLCの移動度 (クロロホルム/メタノール (9/1) での展開で $R_f 0.59$) が、ゼアキサンチンの標準品 (BASF社製) とすべて一致したため、本物質はゼアキサンチンと同一の平面構造を持つものであることが明かになった。そこで、ジエチルエーテル: 2-プロパノール: エタノール 5:5:2 に溶解し、CDスペクトルを測定したところ、3R, 3'R の立体構造をとることがわかったため、本物質をゼアキサンチン (*zeaxanthin*、構造式は第11図参照) と同定した。また、最初の抽出物に見られた黄色色素全体の 13% に相当する色素は、紫外-可視スペクトル、シリカゲルTLC の移動度 (クロロホルム/メタノール (9/1) での展開で $R_f 0.80$)、および、ノバパック HR 6μ C18 (3.9 X 300 mm) (ウォーターズ社製) を用いた HPLC の移動度 (アセトニトリル/メタノール/2-プロパノール (90/6/4) で $1.0\text{ml}/\text{min}$ の速度での展開で RT 19分) より β -クリプトキサンチン (β -*cryptoxanthin*、構造式は第11図参照) であると考えられた。

(4) β -カロチンの同定

pAK98 をリコピン産生大腸菌 JM101 に導入したもの (大腸菌 (pACCRT-E1B、pAK98)) (黄色を呈している) を $150\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の Ap と $30\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の Cm を含む 2YT 培地 2 リットルで、 37°C 、18時間培養した。培養液から集

菌した菌体を、300 ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 ml のヘキサンにより2回抽出した。さらに、ヘキサン層を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (15 X 300 mm) にかけ、ヘキサン／酢酸エチル (50/1) で展開溶出することにより、純品を3 mg 得た。

本物質における紫外-可視スペクトル、FD-MSスペクトル (m/e 536)、および、ノバパック HR 6μ C18 (3.9 X 300 mm) (ウォーターズ社製) を用いたHPLCの移動度 (アセトニトリル／メタノール／2-プロパノール (90/6/4) で 1.0 ml/min の速度で RT 62分) が、 β -カロチンの標準品 (オールトランス型、シグマ社製) とすべて一致したため、本物質を β -カロチン (β -carotene、構造式は第11図参照) と同定した。

実施例8：キサントフィル合成遺伝子群の同定

(1) ケト基導入酵素遺伝子の同定

pAK9 (実施例4) またはpAK92 に含まれる3.9 kbの断片のうち、リコピンからアスタキサンチンの合成に必要なすべての遺伝子は、右側の2.9 kb BamHI断片 (pAK96、第12図) の中に含まれていることが実施例6の結果より明かである。したがって、左側の1.0 kb断片は必要ない。このpAK96の2.9 kb BamHI断片の中に1ヶ所の Nco I 部位と1ヶ所の KpnI 部位が存在する。この NcoI と KpnI 部位の間の1.4 kb断片 (pAK96NK) には水酸基導

入酵素活性が存在し、ケト基導入酵素活性が存在しないことが実施例7(3)の結果よりわかる。また、2.9 kb BamHI断片の中に1ヶ所存在し上記のNcoIとKpnI部位の間にあるSalI部位さらにはこのSalI部位より左のHincII部位から2.9 kb BamHI断片の右側の断片を除いた断片(pAK910およびpAK916)においても、 β -カロチンからカンタキサンチンを合成できるが(実施例7(2))、pAK96の2.9 kb BamHI断片からHincII部位よりさらに左のNcoI部位から右側の断片を除いた断片においては β -カロチンからカンタキサンチンを合成する活性は消失していた。一方、pAK916の0.9 kbのBamHI - HincII断片において、その中の左方に1ヶ所存在するBglIII部位から左側の断片を除いても、上記のBamHI - HincII断片(pAK916)と同様の活性が存在した。したがって、pAK916内の0.74 kbのBglIII - HincII断片の中に β -カロチンを基質としてカンタキサンチンを合成する酵素活性を有するケト基導入酵素をコードする遺伝子が存在し、この遺伝子の中に上記のNcoI部位が存在していると考えられる。塩基配列決定の結果、この遺伝子に相当する、開始コドンの直前にリボソーム結合部位を有する1つのオープン・リーディング・フレームを検出することができたので、これをcrtW遺伝子と命名した。このcrtW遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は第1図(配列番号1)に

示されている。

この Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 の crtW 遺伝子産物 (crtW) は、 β -イオノン環 (β -ionone ring) の 4 位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に転換する酵素活性を有しており、その具体的な例の 1 つが、 β -カロチン (β -carotene) を基質としてエキネノン (echinenone) を経てカンタキサンチン (cantalaxanthin) を合成する酵素活性である (実施例 7 (2)、第 11 図参照)。さらに、crtW 遺伝子産物は、3-ヒドロキシ- β -イオノン環 (3-hydroxy- β -ionone ring) の 4 位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に転換する酵素活性も有しており、その具体的な例の 1 つが、ゼアキサンチン (zeaxanthin) を基質として 4-ケトゼアキサンチン (4-ketozeaxanthin) を経てアスタキサンチン (astaxanthin) を合成する酵素活性である (実施例 7 (1)、第 11 図参照)。なお、このような酵素活性を有するポリペプチドおよびこれをコードする DNA 鎖は、従来知られていなかったものであり、このポリペプチドまたはこれをコードする DNA 鎖は、現在までに知られているどのようなポリペプチドまたは DNA 鎖とも全体的なホモロジーは有していない。また、 β -イオノン環や 3-ヒドロキシ- β -イオノン環に限らず、1 つの酵素がメチレン基をいきなりケト基に変換するという知見は今まで無かったものである。

(2) 水酸基導入酵素遺伝子の同定

pAK96 の 2.9 kb BamH I 断片の中に 1ヶ所の SalI 部位が存在する。この SalI 部位で 2.9 kb BamH I 断片を 2 つの断片に切断して切り出すと、2つの断片 (pAK910 と pAK98) とともに、水酸基導入酵素活性は無くなってしまう。すなわち、左側の断片 (pAK910) にはケト基導入酵素活性しか存在しなく (実施例 7 (2)) 、右側の断片 (pAK98) にはリコピン環化酵素活性しか存在しない (実施例 7 (4))。一方、上記の SalI 部位を含む 1.4 kb の NcoI - KpnI 断片 (pAK96NK) を β -カロチン産生大腸菌に導入すると、 β -クリプトキサンチンを経て、ゼアキサンチンを合成するようになる (実施例 7 (3))。したがって、この 1.4 kb の NcoI - KpnI 断片の中に β -カロチンを基質としてゼアキサンチンを合成する酵素活性を有する水酸基導入酵素をコードする遺伝子が存在し、この遺伝子の中に上記の SalI 部位が存在していると考えられる。塩基配列決定の結果、この遺伝子に相当する、開始コドンの直前にリボソーム結合部位を有する 1 つのオープン・リーディング・フレームを検出することができたので、これを crtZ 遺伝子と命名した。この crtZ 遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は第 2 図 (配列番号 2) に示されている。

この Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 の crt

z 遺伝子産物 (Citz) は、 β -イオノン環 (β -ionone ring) の 3 位の炭素に 1 つの水酸基を付加する酵素活性を有しており、その具体的な例の 1 つが、 β -カロチン (β -carotene) を基質として β -クリプトキサンチン (β -cryptoxanthin) を経てゼアキサンチン (zeaxanthin) を合成する酵素活性である（実施例 7 (3)、第 11 図参照）。さらに、citz 遺伝子産物は、4-ケト- β -イオノン環 (4-keto- β -ionone ring) の 3 位の炭素に 1 つの水酸基を付加する酵素活性も有しており、その具体的な例の 1 つが、カンタキサンチン (canthaxanthin) を基質としてフェニコキサンチン (phoenicoxanthin) を経てアスタキサンチン (astaxanthin) を合成する酵素活性である（実施例 6、第 11 図参照）。なお、後者の酵素活性を有するポリペプチドおよびこれをコードする DNA 鎖は、従来知られていなかったものである。また、Agrobacterium の Citz は、アミノ酸配列レベルで、Erwinia uredovora の Citz と 57% のアイデンティティーという意義深いホモロジーを示した。

(3) リコピン環化酵素遺伝子の同定

pAK96 において 2.9 kb BamH I 断片内の右方にある KpnI 部位から右側の断片を除いた断片 (pAK96K)、さらにはこの KpnI 部位より右にある PstI 部位から右側の断片を除いた断片 (pAK94) においては、 β -カロチンからアスタキサンチンは合成できるが（実施例 6）、リコピ

ンからはアスタキサンチンを合成することはできなくなる。一方、2.9 kb BamH I断片の中に1ヶ所存在し上記の KpnI 部位より左に存在する SalI 部位から右側の断片を含む1.6 kb SalI 断片 (pAK98) をリコピン産生大腸菌に導入すると、 β -カロチンを合成するようになる（実施例7（4））。したがって、この1.6 kb SalI 断片の中にリコピンを基質として β -カロチンを合成する酵素活性を有するリコピン環化酵素をコードする遺伝子が存在し、この遺伝子は、上記の KpnI と PstI 部位にまたがって存在していると考えられる。塩基配列決定の結果、この遺伝子に相当する、開始コドンの直前にリボソーム結合部位を有する1つのオーブン・リーディング・フレームを検出することができたので、これを crtY 遺伝子と命名した。この crtY 遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は第3～4図（配列番号3）に示されている。

なお、この Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 の crtY 遺伝子産物 (Crt Y) は、アミノ酸配列レベルで、Erwinia uredovora の Crt Y と 44.3% のアイデンティティで、という意義深いホモロジーを有しており、酵素の機能も両者で同一である。

実施例9：他の海洋細菌の染色体DNAとのサザン分析

他の海洋微生物の染色体上に単離した crtW と crtZ と相同性を示す領域が得られるか否かを検討した。実施例1

で調製した Alcaligenes sp. PC-1 と Alteromonas sp. SD-402 の染色体 DNA を制限酵素 BamHI および PstI で消化し、アガロースゲル電気泳動法で分離した。全ての分離した DNA 断片を 0.5 N NaOH、1.5 M NaCl のアルカリ溶液で変性した後、一晩かけてナイロンメンブレンにトランスファーさせた。DNA が吸着したナイロンメンブレンをハイブリダイゼーション溶液 (6xDenhardt、5xSSC、100 μ g/ml ssDNA) に浸し、2 時間、60°C でプレハイブリダイゼーションを行なった。次に、pAK96K から BalI で切り出した crtW と crtZ を含む 1.5 kb の DNA 断片を Mega prime TM DNA labelling systems (アマシャム) と [α -32P] dCTP (\sim 110 TBq/mmol) とを用いて標識化し、上記のプレハイブリダイゼーション溶液に加えて 16 時間、60°C でハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、2xSSC、0.1% SDS で 60°C、1 時間洗浄しオートラジオグラフィーによって相同性を示すシグナルを検出した結果、Alcaligenes sp. PC-1 では BamHI 消化物で約 13 kb、PstI 消化物で 2.35 kb の位置に強いシグナルが得られ、Alteromonas sp. SD-402 では BamHI 消化物で約 5.6 kb、PstI 消化物で 20 kb 以上の位置に強いシグナルが得られた。

実施例 10：他の海洋細菌よりのキサントフィル合成遺伝子群の取得

実施例 9 の結果より、Alcaligenes sp. PC-1 の染色体

DNA の PstI 消化物で、2.35 kb 付近に Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1の crtWと crtZ遺伝子を含むDNA 断片とハイブリダイズする領域が存在することがわかったので、Alcaligenes の染色体DNAを PstI で消化した後、2～3.5 kb のサイズのDNA 断片をアガロースゲル電気泳動法により回収した。回収したDNA 断片をベクター pBluescript II SK+の PstI 部位にT4 DNAリガーゼを用いて挿入し、大腸菌DH5 *α*に導入して、Alcaligenes の部分ライプラリーを作製した。この部分ライプラリーを、Agrobacterium の crtWと crtZ遺伝子を含む1.5 kb のDNA 断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションに供した結果、約5000コロニーからポジティブなコロニーを1つ単離した。なお、コロニーハイブリダイゼーションの条件は、実施例9に示したサザン分析法と同条件で行った。続いて、得られたコロニーからプラスミドDNAを単離し、PstI で消化して、組込まれたDNA 断片のサイズを調べたところ、プラスミド中には3つの異なる断片が含まれていることがわかった。そこで、3つの異なるDNA 断片の中から実施例9に示したサザン分析法でハイブリダイズする2.35 kb 断片1つを特定し、アガロースゲル電気泳動法を用いてこの2.35 kb PstI 断片を回収し、再度 pBluescript II SK+の PstI 部位に挿入して、プラスミド pPC11、pPC12を作製した。pPC11と pPC12においては、上記2.35 kb PstI 断片が pBlues

cript II SK+の PstI 部位に互いに逆向きに挿入されたものである。pPC11 の制限酵素地図を第 19 図に示す。

実施例 11 : Alcaligenes キサントフィル合成遺伝子群の塩基配列決定

pPC11 及び pPC12 を β -カロチン産生大腸菌に導入したところ、前者はアスタキサンチン等の合成（実施例 12）により橙色コロニーになったが、後者は新たな色素の合成能を与えるなかった。したがって、プラスミド pPC11 におけるアスタキサンチン合成遺伝子群の方向はベクター lac プロモーターの向きと同じであると考えられた。また、pPC11 をリコピン産生大腸菌に導入しても、新たな色素は産生されなかったので、pPC11 にはリコピン環化酵素遺伝子は含まれていないことがわかった。

pPC11 の挿入断片のうち右側の 0.72 kb BstIII- EcoRV 断片を脱落させたプラスミド（pPC17 と命名、第 19 図）を β -カロチン産生大腸菌に導入しても、pPC11 を導入した場合と同様に、その大腸菌形質転換体はスタキサンチン等を合成することがわかったため（実施例 12）、この pPC17 における 1.63 kb PstI- BstIII 断片の塩基配列の決定を行った。

欠失変異体作製は pPC17 と pPC12 を用いて、以下の手順で行った。pPC17 または pPC12 、それぞれ 10 μ g を KpnI と HindIII または KpnI と EcoRI とで分解した後、フェノール／クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿

によりDNAを回収した。それぞれのDNAを100μlのExo IIIバッファー(50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mM 2-メルカプトエタノール, pH8.0)に溶解し、180ユニットのExo IIIヌクレアーゼを加えて37℃で保温した。1分ごとに10μlをサンプリングして、2サンプル分ずつ、20μlのMBバッファー(40mM Na-acetate, 100mM NaCl, 2mM ZnCl₂, 10%グリセロール, pH4.5)の入った氷上のチューブに移した。サンプリング終了後、得られた5本のチューブを65℃、10分間保温して酵素を失活させた後、5ユニットのマングビーンヌクレアーゼを加えて37℃で30分間保温した。反応後、アガロースゲル電気泳動により、1つのプラスミドについて10種のそれぞれ欠失の程度が異なるDNA断片を回収した。回収したDNAはKlenow fragmentにより末端を平滑化し、16℃、一晩ライゲーション反応した後、大腸菌JM109を形質転換した。得られた種々のクローンについてヘルパーファージM13K07を用いて1本鎖DNAを調製し、アプライドバイオシステム(株)の蛍光プライマーサイクルシークエンスキットを用いてシークエンス反応を行い、自動シークエンサーを用いてDNA配列を決定した。

その結果得られた1631塩基対(bp)からなるDNA配列を第16~18図(配列番号7)に示す。開始コドンの前にリボソーム結合部位が存在するオープン・リーディング・フレームの検索の結果、2種のキサントフィル合

成遺伝子 crtW、crtZ の存在が予想された位置（実施例 13）に各々のタンパク質をコードしうる 2 つのオープンリーディングフレーム（第 16～18 図中 A から B（配列番号 7 の塩基位置 99～824）、C から D（塩基位置 824～1309）が見出された。

実施例 12 : Alcaligenes キサントフィル合成遺伝子群を有する大腸菌が生産する色素の同定

（1）アスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチンの同定

実施例 11 で作製した pPC17 のデレーションプラスミドのうち、右側の Bst E I 末端から第 17 図の塩基番号 1162（配列番号 7 の塩基位置 1162）まで欠失したデレーションプラスミド（crtWのみを有する）を pPC17-3（第 19 図）と名付けた。

この pPC17-3 をゼアキサンチン産生大腸菌 JM101（実施例 7 (1)）に導入したもの（大腸菌 (pACCAR25Δ crtX、pPC17-3)）（橙色を呈している）を 150 μ g / ml の Ap と 30 μ g / ml の Cm を含む YT 培地 2 リットルで、37°C、18 時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300 ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 ml のクロロホルム / メタノール (9 / 1) で 2 回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを小量のクロロホルム / メタノール (9 / 1) に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲル TLC プレートを用いて、クロロホルム / メタノール

(15/1) で展開することにより、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。元の橙色色素は、この TLC により、 R_f 値 0.54 (約 25%)、0.72 (約 30%)、0.91 (約 25%) の 3 スポットに分かれた。 R_f 値 0.54 と 0.72 の色素を、TLC プレートから、かきとり後、小量のクロロホルム/メタノール (9/1) またはメタノールに溶解し、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー (15 X 300 mm) にかけ、クロロホルム/メタノール (9/1) またはメタノールで展開溶出することにより、各々の純品を約 1 mg づつ得た。

これらの物質における紫外-可視スペクトル、FD-MS スペクトル、および、シリカゲル TLC の移動度 (クロロホルム/メタノール (15/1) で展開) が、4-ケトゼアキサンチン、及び、アスタキサンチンの標準品 (実施例 6、7 (1)) とすべて一致したため、これらの物質を 4-ケトゼアキサンチン (R_f 0.54)、及び、アスタキサンチン (R_f 0.72) と同定した。なお、 R_f 値 0.91 の色素はカンタキサンチンであった (実施例 12 (2))。

また、pPC11 または pPC17 を β -カロチン産生大腸菌 JM101 に導入したもの (大腸菌 (pACCAR16Δ crtX、pPC11 または pPC17)) (橙色を呈している) もアスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチン及びカンタキサンチンを産生することが同様の分析により確認された。さらに、これらは、微量のフェニコキサンチンを生産することが

実施例 6 で得られた標品を用いて確認された。

(2) カンタキサンチンの同定

pPC17-3 を β -カロチン産生大腸菌 JM101 に導入したもの（大腸菌（pACCAR16Δ crtX、pPC17-3））（橙色を呈している）を 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Ap と 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Cm を含む 2YT 培地 2 リットルで、37°C、18 時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300 ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 ml のクロロホルム／メタノール (9/1) で 2 回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを小量のクロロホルム／メタノール (9/1) に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲル TLC プレートを用いて、クロロホルム／メタノール (50/1) で展開することにより、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。橙色色素全体の 40% に相当する最も濃い色素を、TLC プレートから、かきとった。さらに小量のクロロホルム／メタノール (9/1) またはクロロホルム／メタノール (1/1) に溶解後、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー (15 × 300 mm) にかけ、クロロホルム／メタノール (9/1) またはクロロホルム／メタノール (1/1) で展開溶出することにより、純品を 2 mg 得た。

本物質における紫外-可視スペクトル、FD-MS スペクトル (m/e 564)、および、シリカゲル TLC の移動度（クロロホルム／メタノール (50/1) で展開）が、カンタキサンチンの標準品 (BASF 社製) とすべて一致した

ため、本物質をカンタキサンチンと同定した。また、最初の抽出物に見られた橙色色素全体の50%に相当する色素は、紫外-可視スペクトル、シリカゲルTLCの移動度（クロロホルム/メタノール（50/1）で展開）、および、ノバパックHR 6 μ C18 (3.9 X 300 mm) (ウォーターズ社製) を用いたHPLCの移動度（アセトニトリル/メタノール/2-プロパノール（90/6/4）で展開）（実施例7（2）参照）よりエキネノンであると考えられた。なお、抽出された色素の残りの10%は未反応の β -カロチンであった。

（3）ゼアキサンチンの同定

pPC11における1.15 kb SalI 断片をpPC11と同じ方向にpBluescript II SK+のSalI部位に挿入したプラスミド（pPC13と命名、第19図参照）を作製した。

このpPC13を β -カロチン産生大腸菌JM101に導入したもの（大腸菌（pACCAR16Δ crtX、pPC13））（黄色を呈している）を150 μ g/mlのApと30 μ g/mlのCmを含む2YT培地2リットルで、37°C、18時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300 mlのアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 mlのクロロホルム/メタノール（9/1）で2回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを小量のクロロホルム/メタノール（9/1）に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲルTLCプレートを用いて、クロロホルム/メタノール（9/1）で展開する

ことにより、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。黄色色素全体の 90% に相当する最も濃い 色素を、TLC プレートから、かきとった。さらに小量のクロロホルム / メタノール (9 / 1) またはメタノールに溶解後、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー (15 X 300 mm) にかけ、クロロホルム / メタノール (9 / 1) またはメタノールで展開溶出することにより、純品を 3 mg 得た。

本物質における紫外 - 可視スペクトル、FD-MS スペクトル ($m/e 568$) 、および、シリカゲル TLC の移動度 (クロロホルム / メタノール (9 / 1) で展開) が、ゼアキサンチンの標準品 (実施例 7 (3)) とすべて一致したため、本物質をゼアキサンチンと同定した。また、最初の抽出物に見られた黄色色素全体の 10% に相当する色素は、紫外 - 可視スペクトル、シリカゲル TLC の移動度 (クロロホルム / メタノール (9 / 1) で展開) 、および、ノバパック HR 6 μ C18 (3.9 X 300 mm) (ウォーターズ社製) を用いた HPLC の移動度 (アセトニトリル / メタノール / 2-プロパノール (90 / 6 / 4) で展開) (実施例 7 (3) 参照)) より β - クリプトキサンチンであると考えられた。

実施例 13 : Alcaligenes キサントフィル合成遺伝子群の同定

(1) ケト基導入酵素遺伝子の同定

pPC11 に含まれる 2.35 kb の PstI 断片のうち、 β -カロチンからアスタキサンチンの合成に必要なすべての遺伝子は、左側の 1.63 kb PstI-BstEII 断片 (pPC17、第 19 図) の中に含まれていることが実施例 1 1 及び 1 2 (1) の結果より明かである。したがって、右側の 0.72 kb BstEII-PstI 断片は必要ない。この pPC17 の 1.63 kb PstI-BstEII 断片の中に 1 ケ所の SmaI 部位と 1 ケ所の Sall 部位が存在する (第 19 図)。この SmaI および Sall 部位の左の 0.65 kb および 0.69 kb の断片を取り除くと、いずれもケト基導入酵素活性が無くなることは、これらのデレーションプラスミドを β -カロチン産生大腸菌に導入したものを用いた色素分析により確認した。また、1.63 kb PstI-BstEII 断片の左側の 0.69 kb PstI-Sall 断片を pBluescript SK+ の PstI-Sall 部位に挿入したプラスミドはケト基導入酵素活性を持たないことは、このプラスミドを β -カロチン産生大腸菌に導入したものを用いた色素分析により確認した。一方、右側の BstEII 末端から第 17 図の塩基番号 1162 (配列番号 7 の塩基位置 1162) まで欠失したデレーションプラスミド pPC17-3 (第 19 図) にはケト基導入酵素活性が存在すること (実施例 1 2 (1)(2)) から、pPC17-3 内の 1162 bp 断片内に β -カロチンまたはゼアキサンチンを基質としてカンタキサンチンまたはアスタキサンチンを合成する酵素活性を有するケト基導入酵素

をコードする遺伝子が存在し、この遺伝子の中に上記の SmaI 部位と SalI 部位が存在していると考えられる。塩基配列決定の結果、この遺伝子に相当する、開始コドンの直前にリボソーム結合部位を有するオープン・リーディング・フレームを検出することができたので、これを crtW 遺伝子と命名した。この crtW 遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は第 13 ~ 14 図 (配列番号 5) に示されている。

この Alcaligenes sp. PC-1 の crtW 遺伝子産物 (CrtW) は、 β -イオノン環 (β -ionone ring) の 4 位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に転換する酵素活性を有しており、その具体的な例の 1 つが、 β -カロチン (β -carotene) を基質としてエキネノン (echinone) を経てカンタキサンチン (canthaxanthin) を合成する酵素活性である (実施例 12 (2)、第 11 図参照)。さらに、crtW 遺伝子産物は、3-ヒドロキシ- β -イオノン環 (3-hydroxy- β -ionone ring) の 4 位のメチレン (methylene) 基をケト (keto) 基に転換する酵素活性も有しており、その具体的な例の 1 つが、ゼアキサンチン (zeaxanthin) を基質として 4-ケトゼアキサンチン (4-ketozeaxanthin) を経てアスタキサンチン (astaxanthin) を合成する酵素活性である (実施例 12 (1)、第 11 図参照)。なお、このような酵素活性を有するポリペプチドおよびこれをコードする DNA 鎖は、従来

知られていなかったものであり、このポリペプチドまたはこれをコードするDNA鎖は、現在までに知られているどのようなポリペプチドまたはDNA鎖とも全体的なホモロジーは有していない。なお、Agrobacterium aurantia cus sp. nov. MK1とAlcaligenes sp. PC-1間のcrtW遺伝子産物（CrtW）は、アミノ酸配列レベルで83%のアイデンティティーという高いホモロジーを有しており、酵素の機能も両者で同一である。これらのアミノ酸配列の中で、アイデンティティーを有さない17%の領域のアミノ酸配列は、酵素の機能にそれほど重要ではないと考えられる。したがって、特に、この領域においては、少しくらい他のアミノ酸と置換、あるいは、欠失、または他のアミノ酸の付加を行っても酵素活性に影響は与えないと考えられる。

海洋細菌のケト基導入酵素遺伝子crtWは、3位の位置に水酸基が付加しているしていないにかかわりなく、4位のメチレン基を直接ケト基に変換する β -イオノンまたは3-ヒドロキシ- β -イオノン環ケト基導入酵素（ β -ionone or 3-hydroxy- β -ionone ring ketolase）をコードしているということができる。なお、 β -イオノン環や3-ヒドロキシ- β -イオノン環に限らず、1つの酵素がメチレン基をいきなりケト基に変換するという知見は今まで存在しなかったものである。

（2）水酸基導入酵素遺伝子の同定

β -カロチンからアスタキサンチンの合成に必要なすべての遺伝子は、pPC17 の 1.63 kb PstI-BstEII 断片（第19図）の中に含まれている。このpPC17 の 1.63 kb PstI-BstEII 断片の中に1ヶ所の Sall 部位が存在する。この Sall 部位の右側の断片に水酸基導入酵素活性が存在することは実施例12(3)の結果より明かである。したがって、水酸基導入酵素遺伝子は、1.63 kb PstI-BstEII 断片のうち右側の断片である 0.94 kb Sall-BstEII 断片に存在することがわかる。塩基配列決定の結果、この遺伝子に相当する、開始コドンの直前にリボソーム結合部位を有する1つのオーブン・リーディング・フレームを検出することができたので、これを critZ 遺伝子と命名した。この critZ 遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は第15図（配列番号6）に示されている。

この Alcaligenes sp. PC-1の critZ 遺伝子産物（CritZ）は、 β -イオノン環（ β -ionone ring）の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有しており、その具体的な例の1つが、 β -カロチン（ β -carotene）を基質として β -クリプトキサンチン（ β -cryptoxanthin）を経てゼアキサンチン（zeaxanthin）を合成する酵素活性である（実施例12(3)、第11図参照）。さらに、critZ 遺伝子産物は、4-ケト- β -イオノン環（4-keto- β -ionone ring）の3位の炭素に1つの水酸基を付加

する酵素活性も有しており、その具体的な例の1つが、カンタキサンチン (canthaxanthin) を基質としてフェニコキサンチン (phoenicoxanthin) を経てアスタキサンチン (astaxanthin) を合成する酵素活性である（実施例12(1)、第11図参照）。なお、後者の酵素活性を有するポリペプチドおよびこれをコードするDNA鎖は、従来知られていなかったものである。また、Alcaligenes sp. PC-1 の CrtZ は、アミノ酸配列レベルで、Erwinia uredovora の CrtZ と 58% のアイデンティティーという意義深いホモロジーを示した。なお、Agrobacterium aurantiacum sp. nov. MK1 と Alcaligenes sp. PC-1 間の crtZ 遺伝子産物 (CrtZ) は、アミノ酸配列レベルで、90% のアイデンティティーという高いホモロジーを有しており、酵素の機能も両者で同一である。これらのアミノ酸配列の中で、アイデンティティーを有さない 10% の領域のアミノ酸配列は、酵素の機能にそれほど重要ではないと考えられる。したがって、特に、この領域においては、少しくらい他のアミノ酸と置換、あるいは、欠失、または他のアミノ酸の付加を行っても酵素活性に影響は与えないと考えられる。

(3) マイナーなキサントフィル生合成経路の考察

植物常在細菌 Erwinia や光合成細菌 Rhodobacter のカロチノイド合成遺伝子を用いた我々の研究により、一般に、カロチノイド生合成酵素は、基質となるカロチノイ

ド分子の半分を認識して作用することが明かになってきた。たとえば、Erwinia のリコピン環化酵素遺伝子である crtY はリコピン分子の半分ずつを認識して環化する。したがって、Rhodobacter のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子 crtI を用いることによりリコピンの変わりにノイロスボレンを大腸菌に合成させ、これに Erwinia の crtY を作用させると、ノイロスボレンにおけるリコピンと共通な半分の分子構造だけを crtY 遺伝子産物は認識し、半分だけ環化した β -ゼアカロチンを產生する (Linden, H., Misawa, N., Chamovitz, D., Pecker, I., Hirschberg, J., Sandmann, G., 'Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenes'. Z. Naturforsch., 46c, p. 1045-1051, 1991)。また、本発明においても、 β -カロチンやゼアキサンチンに crtW を作用させると、まず 1 つケト基が導入されたエキネノンや 4-ケトゼアキサンチンが合成されるし、 β -カロチンやカンタキサンチンに crtZ を作用させると、まず 1 つ水酸基が導入された β -クリプトキサンチンやフェニコキサンチンが合成される。これは、これらの酵素が基質の半分の分子を認識するからと考えることができる。したがって、たとえば、Erwinia の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子と海洋細菌の crtZ を有する大腸菌は、前述したように、ゼアキサンチンを產生するが、その中

間代謝産物として、 β -カロチンに1つ水酸基が導入された β -クリプトキサンチンを検出することができる。このことは、そこにCrtWが存在すると、 β -クリプトキサンチンを基質として3'-ヒドロキシエキネノンや3-ヒドロキシエキネノンを合成することができ、さらに、これらにCrtWが作用してフェニコキサンチンを合成することができると考えることができる。今回、我々は、培養物中にこれらのケトカロチノイドを同定するには至っていないが、その理由は、今回行われた条件では、これらが微量しか存在しないためであると思われる。事実、一方の遺伝子源である海洋細菌 Agrobacterium aurantia cus sp. nov. MK1におけるマイナーなアスタキサンチン中間代謝産物として、3-ヒドロキシエキネノンや3'-ヒドロキシエキネノンの検出が報告されている（横山昭裕、幹渉、「海洋性細菌におけるアスタキサンチン生合成について」平成6年度日本水産学会春季大会講演要旨集、p. 252, 1994）。以上のことより、第11図に示したアスタキサンチンの主要代謝経路の他に、図20に示したマイナーな代謝経路も存在すると考えることができる。

産業上の利用可能性

本発明において、海洋細菌よりアスタキサンチンやその他のケト基を含むキサントフィル（アスタキサンチン、フェニコキサンチン、4-ケトゼアキサンチン、カンタ

キサンチン、エキネノン) の生合成に必要な遺伝子群の取得に成功し、それらの遺伝子の構造ないし塩基配列およびそれらの機能を明かになった。従って、本発明によるDNA鎖は、それらを外来遺伝子として遺伝子工学的手法により大腸菌等の微生物を形質転換し発現させることによって、大腸菌等の微生物にアスタキサンチンやその他のケト基を含むキサントフィルの生合成能を付与することが可能な遺伝子として有用である。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：639

配列の型：鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：Agrobacterium aurantiacum

株名：sp. nov. MK1

配列

GTG CAT GCG CTG TGG TTT CTG GAC GCA GCG GCG CAT CCC ATC CTG GCG	48
Met His Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala	
1 5 10 15	
ATC GCA AAT TTC CTG GGG CTG ACC TGG CTG TCG GTC GGA TTG TTC ATC	96
Ile Ala Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile	
20 25 30	
ATC GCG CAT GAC GCG ATG CAC GGG TCG GTG GTG CCG GGG CGT CCG CGC	144
Ile Ala His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg	
35 40 45	
GCC AAT GCG GCG ATG GGC CAG CTT GTC CTG TGG CTG TAT GCC GGA TTT	192
Ala Asn Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe	
50 55 60	

TCG TGG CGC AAG ATG ATC GTC AAG CAC ATG GCC CAT CAC CGC CAT GCC 240
 Ser Trp Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala
 65 70 75 80
 GGA ACC GAC GAC GAC CCC GAT TTC GAC CAT GGC GGC CCG GTC CGC TGG 288
 Gly Thr Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp
 85 90 95
 TAC GCC CGC TTC ATC GGC ACC TAT TTC GGC TGG CGC GAG GGG CTG CTG 336
 Tyr Ala Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu
 100 105 110
 CTG CCC GTC ATC GTG ACG GTC TAT GCG CTG ATC CTT GGG GAT CGC TGG 384
 Leu Pro Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp
 115 120 125
 ATG TAC GTG GTC TTC TGG CCG CTG CCG TCG ATC CTG GCG TCG ATC CAG 432
 Met Tyr Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gin
 130 135 140
 CTG TTC GTG TTC GGC ACC TGG CTG CCG CAC CGC CCC GGC CAC GAC GCG 480
 Leu Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala
 145 150 155 160
 TTC CCG GAC CGC CAC AAT GCG CGG TCG TCG CGG ATC AGC GAC CCC GTG 528
 Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val
 165 170 175
 TCG CTG CTG ACC TGC TTT CAC TTT GGC GGT TAT CAT CAC GAA CAC CAC 576
 Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His
 180 185 190

CTG CAC CCG ACG GTG CCG TGG TGG CGC CTG CCC AGC ACC CGC ACC AAG 624

Leu His Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys

195

200

205

GGG GAC ACC GCA TGA

639

Gly Asp Thr Ala ***

210

配列番号：2

配列の長さ：489

配列の型：鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：Agrobacterium aurantiacum

株名：sp. nov. MK1

配列

ATG ACC AAT TTC CTG ATC GTC GTC GCC ACC GTG CTG GTG ATG GAG TTG	48
Met Thr Asn Phe Leu Ile Val Val Ala Thr Val Leu Val Met Glu Leu	
1 5 10 15	
ACG GCC TAT TCC GTC CAC CGC TGG ATC ATG CAC GGC CCC CTG GGC TGG	96
Thr Ala Tyr Ser Val His Arg Trp Ile Met His Gly Pro Leu Gly Trp	
20 25 30	
GGC TGG CAC AAG TCC CAC CAC GAG GAA CAC GAC CAC GCG CTG GAA AAG	144
Gly Trp His Lys Ser His His Glu Glu His Asp His Ala Leu Glu Lys	
35 40 45	
AAC GAC CTG TAC GGC CTG GTC TTT GCG GTG ATC GCC ACG GTG CTG TTC	192
Asn Asp Leu Tyr Gly Leu Val Phe Ala Val Ile Ala Thr Val Leu Phe	
50 55 60	

ACG GTG GGC TGG ATC TGG GCG CCG GTC CTG TGG TGG ATC GCC TTG GGC	240		
Thr Val Gly Trp Ile Trp Ala Pro Val Leu Trp Trp Ile Ala Leu Gly			
65	70	75	80
ATG ACT GTC TAT GGG CTG ATC TAT TTC GTC CTG CAT GAC GGG CTG GTG	288		
Met Thr Val Tyr Gly Leu Ile Tyr Phe Val Leu His Asp Gly Leu Val			
85	90	95	
CAT CAG CGC TGG CCG TTC CGT TAT ATC CCG CGC AAG GGC TAT GCC AGA	336		
His Gln Arg Trp Pro Phe Arg Tyr Ile Pro Arg Lys Gly Tyr Ala Arg			
100	105	110	
CGC CTG TAT CAG GCC CAC CGC CTG CAC CAT GCG GTC GAG GGG CGC GAC	384		
Arg Leu Tyr Gln Ala His Arg Leu His His Ala Val Glu Gly Arg Asp			
115	120	125	
CAT TGC GTC AGC TTC GGC TTC ATC TAT GCG CCC CCG GTC GAC AAG CTG	432		
His Cys Val Ser Phe Gly Phe Ile Tyr Ala Pro Pro Val Asp Lys Leu			
130	135	140	
AAG CAG GAC CTG AAG ATG TCG GGC GTG CTG CGG GCC GAG GCG CAG GAG	480		
Lys Gln Asp Leu Lys Met Ser Gly Val Leu Arg Ala Glu Ala Gln Glu			
145	150	155	160
CGC ACG TGA	489		
Arg Thr ---			

配列番号：3

配列の長さ：1161

配列の型：鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：Agrobacterium aurantiacum

株名：sp. nov. MK1

配列

GTG ACC CAT GAC GTG CTG CTG GCA GGG GCG GGC CTT GCC AAC GGG CTG	48
Met Thr His Asp Val Leu Leu Ala Gly Ala Gly Leu Ala Asn Gly Leu	
1 5 10 15	
ATC GCC CTG GCG CTG CGC GCG CGG CCC GAC CTG CGC GTG CTG CTG	96
Ile Ala Leu Ala Leu Arg Ala Ala Arg Pro Asp Leu Arg Val Leu Leu	
20 25 30	
CTG GAC CAT GCC GCA GGA CCG TCA GAC GGC CAC ACC TGG TCC TGC CAC	144
Leu Asp His Ala Ala Gly Pro Ser Asp Gly His Thr Trp Ser Cys His	
35 40 45	
GAC CCC GAC CTG TCG CCG GAC TGG CTG GCG CGG CTG AAG CCC CTG CGC	192
Asp Pro Asp Leu Ser Pro Asp Trp Leu Ala Arg Leu Lys Pro Leu Arg	
50 55 60	

CGC GCC AAC TGG CCC GAC CAG GAG GTG CGC TTT CCC CGC CAT GCC CGG 240
 Arg Ala Asn Trp Pro Asp Gln Glu Val Arg Phe Pro Arg His Ala Arg
 65 70 75 80
 CGG CTG GCC ACC GGT TAC GGG TCG CTG GAC GGG GCG GCG CTG GCG GAT 288
 Arg Leu Ala Thr Gly Tyr Gly Ser Leu Asp Gly Ala Ala Leu Ala Asp
 85 90 95
 GCG GTG GTC CGG TCG GGC GCC GAG ATC CGC TGG GAC AGC GAC ATC GCC 336
 Ala Val Val Arg Ser Gly Ala Glu Ile Arg Trp Asp Ser Asp Ile Ala
 100 105 110
 CTG CTG GAT GCG CAG GGG GCG ACG CTG TCC TGC GGC ACC CGG ATC GAG 384
 Leu Leu Asp Ala Gln Gly Ala Thr Leu Ser Cys Gly Thr Arg Ile Glu
 115 120 125
 GCG GGC GCG GTC CTG GAC GGG CGG GGC GCG CAG CCG TCG CGG CAT CTG 432
 Ala Gly Ala Val Leu Asp Gly Arg Gly Ala Gln Pro Ser Arg His Leu
 130 135 140
 ACC GTG GGT TTC CAG AAA TTC GTG GGT GTC GAG ATC GAG ACC GAC CGC 480
 Thr Val Gly Phe Gln Lys Phe Val Gly Val Glu Ile Glu Thr Asp Arg
 145 150 155 160
 CCC CAC GGC GTG CCC CGC CCG ATG ATC ATG GAC GCG ACC GTC ACC CAG 528
 Pro His Gly Val Pro Arg Pro Met Ile Met Asp Ala Thr Val Thr Gln
 165 170 175
 CAG GAC GGG TAC CGC TTC ATC TAT CTG CTG CCC TTC TCT CCG ACG CGC 576
 Gln Asp Gly Tyr Arg Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Phe Ser Pro Thr Arg
 180 185 190

ATC CTG ATC GAG GAC ACG CGC TAT TCC GAT GGC GGC GAT CTG GAC GAC 624
 Ile Leu Ile Glu Asp Thr Arg Tyr Ser Asp Gly Gly Asp Leu Asp Asp
 195 200 205
 GAC GCG CTG GCG GCG TCC CAC GAC TAT GCC CGC CAG CAG GGC TGG 672
 Asp Ala Leu Ala Ala Ala Ser His Asp Tyr Ala Arg Gln Gln Gly Trp
 210 215 220
 ACC GGG GCC GAG GTC CGG CGC GAA CGC GGC ATC CTT CCC ATC GCG CTG 720
 Thr Gly Ala Glu Val Arg Arg Glu Arg Gly Ile Leu Pro Ile Ala Leu
 225 230 235 240
 GCC CAT CAT GCG GCG GGC TTC TGG GCC GAT CAC GCG GCG GGG CCT GTT 768
 Ala His Asp Ala Ala Gly Phe Trp Ala Asp His Ala Ala Gly Pro Val
 245 250 255
 CCC GTG GGA CTG CGC GCG GGG TTC TTT CAT CCG GTC ACC GGC TAT TCG 816
 Pro Val Gly Leu Arg Ala Gly Phe Phe His Pro Val Thr Gly Tyr Ser
 260 265 270
 CTG CCC TAT GCG GCA CAG GTG GCG GAC GTG GTG GCG GGT CTG TCC GGG 864
 Leu Pro Tyr Ala Ala Gln Val Ala Asp Val Val Ala Gly Leu Ser Gly
 275 280 285
 CCG CCC GGC ACC GAC GCG CTG CGC GGC GCC ATC CGC GAT TAC GCG ATC 912
 Pro Pro Gly Thr Asp Ala Leu Arg Gly Ala Ile Arg Asp Tyr Ala Ile
 290 295 300
 GAC CGG GCG CGC CGC GAC CGC TTT CTG CGC CTT TTG AAC CGG ATG CTG 960
 Asp Arg Ala Arg Arg Asp Arg Phe Leu Arg Leu Leu Asn Arg Met Leu
 305 310 315 320

TTC CGC GGC TGC GCG CCC GAC CGG CGC TAT ACC CTG CTG CAG CGG TTC 1008
Phe Arg Gly Cys Ala Pro Asp Arg Arg Tyr Thr Leu Leu Gln Arg Phe
325 330 335
TAC CGC ATG CCG CAT GGA CTG ATC GAA CGG TTC TAT GCC GGC CGG CTG 1056
Tyr Arg Met Pro His Gly Leu Ile Glu Arg Phe Tyr Ala Gly Arg Leu
340 345 350
AGC GTG GCG GAT CAG CTG CGC ATC GTG ACC GGC AAG CCT CCC ATT CCC 1104
Ser Val Ala Asp Gln Leu Arg Ile Val Thr Gly Lys Pro Pro Ile Pro
355 360 365
CTT GGC ACG GCC ATC CGC TGC CTG CCC GAA CGT CCC CTG CTG AAG GAA 1152
Leu Gly Thr Ala Ile Arg Cys Leu Pro Glu Arg Pro Leu Leu Lys Glu
370 375 380
AAC GCA TGA 1161
Asn Ala ***
385

配列番号：4

配列の長さ：2886

配列の型：鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：Agrobacterium aurantiacus

株名：sp. nov. MK1

配列

GGATCCGGCG ACCTTGGCGC GCTGCGCCGC GCGCCCTTGC TGGTGCCTGG GCCGGGTGGC 60

CCTAGGCCGC TGGAACGCCG CGACGCCGGCG CGCGGAAACG ACCACGGACC CGGCCACCG

CAATGGTCGC AAGCAACGGG GATGGAAACC GGCGATGCGG GACTGTAGTC TGCGCGGATC 120

GTTACCAGCG TTCGTTGCC C TACCTTTGG CCGCTACGCC CTGACATCAG ACGCGCCTAG

GCCGGTCCGG GGGACAAGAT GAGCGCACAT GCCCTGCCA AGGCAGATCT GACCGCCACC 180

CGGCCAGGCC C CCGTCTA CTCGCGTGT A CGGGACGGGT TCCGTCTAGA CTGGCGGTGG

AGCCTGATCG TCTCGGGCGG CATCATCGCC GCTTGGCTGG CCCTGCATGT GCATGCCCTG 240

TCCGACTAGC AGAGCCCCGC GTAGTAGCGG CGAACCGACC GGGACGTACA CGTACGCCAC

TGGTTCTGG ACGCAGCGGC GCATCCCATC CTGGCGATCG CAAATTCCT GGGGCTGACC 300

ACCAAAAGACC TGGTGCGCCG CGTAGGGTAG GACCGCTAGC GTTTAAAGGA CCCCCGACTGG

TGGCTGTCGG TCGGATTGTT CATCATCGCG CATGACCGCGA TGCACGGGTC GGTGGTGGCG 360
ACCGACAGCC AGCCTAACAA GTAGTAGCGC GTACTGCGCT ACGTGCCCAG CCACCCACGGC

GGGC GTCCGC GCGCCAATGC GGCGATGGGC CAGCTTGTC C TGTGGCTGTA TGCCGGATT 420
CCCCGAGGCG CGCGGTTACG CCGCTACCCG GTCGAACAGG ACACCGACAT ACGGCCTAAA

TCGTGGCGCA AGATGATCGT CAAGCACATG GCCCATCACCC GCGATGCCGG AACCGACGAC 480
AGCACCGCGT TCTACTAGCA GTTCGTGTAC CGGGTAGTGG CGGTACGGCC TTGGCTGCTG

GACCCCGATT TCGACCATGG CGGCCCGGTC CGCTGGTACG CCCGCTTCAT CGGCACCTAT 540
CTGGGGCTAA AGCTGGTACC GCGGGGCCAG GCGACCATGC GGGCGAAGTA GCCGTGGATA

TTCGGCTGGC GCGAGGGCCT GCTGCTGCC C GTCATCGTGA CGGTCTATGC GCTGATCCTT 600
AAGCCGACCG CGCTCCCCGA CGACGACGGG CAGTAGCACT GCCAGATACT CGACTAGGAA

GGGGATCGCT GGATGTACGT GGTCTTCTGG CCGCTGCCGT CGATCCTGGC GTCGATCCAG 660
CCCCTAGCGA CCTACATGCA CCAGAAGACC GGCACGGCA GCTAGGACCG CAGCTAGGTC

CTGTTCGTGT TCGGCACCTG GCTGCCGCAC CGCCCCGGCC ACGACCGCTT CCCGGACCCG 720
GACAAGCACA AGCCGTGGAC CGACGGCGTG GCGGGGCCGG TGCTGCGCAA GGGCCTGGCG

CACAATGCCG GGTGTCGCG GATCAGCGAC CCCGTGTCGC TGCTGACCTG CTTTCACTTT 780
GTGTTACGCG CCAGCAGCGC CTAGTCGCTG GGGCACAGCG ACCACTGGAC GAAAGTGAAA

GGCGGTTATC ATCACGAACA CCACCTGCAC CCGACGGTGC CGTGGTGGCG CCTGCCAGC 840
CCGCCAATAG TAGTGCTTGT GGTGGACGTG GGCTGCCACG GCACCACCGC GGACGGGTG

ACCCGCACCA AGGGGGACAC CGCATGACCA ATTCCTGAT CGTCGTCGCC ACCGTGCTGG 900
TGGGCGTGGT TCCCCCTGTG GCGTACTGGT TAAAGGACTA GCAGCAGCGG TGGCACGACC

TGATGGAGTT GACGGCCTAT TCCGTCCACC GCTGGATCAT GCACGGCCCC CTGGGCTGGG 960
ACTACCTCAA CTGCCGGATA AGGCAGGTGG CGACCTAGTA CGTCCCCGGG GACCCGACCC

GCTGGCACAA GTCCCACAC GAGGAACACG ACCACGGCT GGAAAAGAAC GACCTGTACG 1020
CGACCGTGTGTT CAGGGTGGTG CTCCCTGTGC TGGTGCGCGA CCTTTCTTG CTGGACATGC

GCCTGGTCTT TGCGGTGATC CCCACGGTGC TGTTCACGGT GGGCTGGATC TGGGCGCCGG 1080
CGGACCAGAA ACGCCACTAG CGGTGCCACG ACAAGTGCCA CCCGACCTAG ACCCGCGGCC

TCCTGTGGTG GATCGCCTTG GGCATGACTG TCTATGGCT GATCTATTG GTCCTGCATG 1140
AGGACACCAAC CTAGCGGAAC CCGTACTGAC AGATAACCGA CTAGATAAAG CAGGACGTAC

ACGGGCTGGT GCATCAGCGC TGGCCGTTCC GTTATATCCC GCGCAAGGGC TATGCCAGAC 1200
TGCCCCACCA CGTAGTCGCG ACCGGCAAGG CAATATAAGG CGCGTTCCCG ATACGGTCTG

GCCTGTATCA GGCCCACCGC CTGCACCATG CGGTGAGGG GCGCGACCAT TGCGTCAGCT 1260
CGGACATAGT CCGGGTGGCG GACGTGGTAC GCCAGCTCCC CGCGCTGGTA ACGCAGTCGA

TCGGCTTCAT CTATGCGCCC CCGGTCGACA AGCTGAAGCA GGACCTGAAG ATGTCGGGCG 1320
AGCCGAAGTA GATA CGCGGG GGCCAGCTGT TCGACTTCGT CCTGGACTTC TACAGCCCCC

TGCTGCGGGC CGAGGCGCAG GAGCGCACGT GACCCATGAC GTGCTGCTGG CAGGGGCGGG 1380
ACGACGCCCG GCTCCGCGTC CTCGCGTGC A CTGGGTACTG CACGACGACC GTCCCCGCC

CCTTGCCAAC GGGCTGATCG CCCTGGCGCT GCGCGCGGG CGGCCCCGACC TGC GCGTGCT 1440
GGAACGGTTG CCCGACTAGC GGGACCGCGA CGCGCGCCGC GCGGGCTGG ACGCGCACGA

GCTGCTGGAC CATGCCGAG GACCGTCAGA CGGCCACACC TGGTCCTGCC ACGACCCCCGA 1500
CGACGACCTG GTACGGCGTC CTGGCAGTCT GCGGGTGTGG ACCAGGACGG TGCTGGGCT

CCTGTGCCG GACTGGCTGG CGCGGCTGAA GCGCCCTGCC CGCGCCAAGT GCGGGACCA 1560
GGACAGCGGC CTGACCGACC GCGCCGACTT CGGGGACGCG GCGCGGTTGA CGGGGCTGGT

GGAGGTGCGC TTTCCCCGCC ATGCCCGCG GCTGGCCACC GGTTACGGGT CGCTGGACGG 1620
CCTCCACCGCG AAAGGGGCGG TACGGGCCGC CGACCGGTGG CCAATGCCCA GCGACCTGCC

GGCGGGCGCTG CGGGATGCGG TGGTCCGGTC GGGCGCCGAG ATCCGCTGGG ACAGCGACAT 1680
CCGCGCGGAC CGCCTACGCC ACCAGGCCAG CCCGCGGCTC TAGGCGACCC TGTGCTGTA

CGCCCTGCTG GATGCGCAGG GGGCGACGCT GTCCCTGCCGAC ACCCGGATCG AGGCGGGCGC 1740
GCGGGACGAC CTACGCGTCC CCCGCTGCCA CAGGACGCCG TGGGCCTAGC TCCGCCCGCG

GGTCCTGGAC GGGCGGGCG CGCAGCCGTC GCGGCATCTG ACCGTGGTT TCCAGAAATT 1800
CCAGGACCTG CCCGCCCCGC GCGTCGGCAG CGCCGTAGAC TGGCACCCAA AGGTCTTAA

CGTGGGTGTC GAGATCGAGA CCGACCGCCC CCACGGCGTG CCCCCGCCCAGA TGATCATGGA 1860
GCACCCACAG CTCTAGCTCT GGCTGGCGGG GGTGCCGAC GGGGCGGGCT ACTAGTACCT

CGCGACCGTC ACCCAGCAGG ACGGGTACCG CTTCATCTAT CTGCTGCCCT TCTCTCCGAC 1920
GCGCTGGCAG TGGTCTGTCC TGGCCATGGC GAACTAGATA GACGACGGGA AGAGAGGCTG

GCGCATCCTG ATCGAGGACA CGCGCTATTG CGATGGCGGC GATCTGGACG ACGACGGCCT 1980
CGCGTAGGAC TAGCTCCTGT GCGCGATAAG GCTACCGCCG CTAGACCTGC TGCTGCCGGA

GGCGGGCGCG TCCCACGACT ATGCCCCCCA GCAGGGCTGG ACCGGGGCCG AGGTCCGGCG 2040
CCGCCCCCGC AGGGTGCTGA TACGGGGCGGT CGTCCCGACC TGGCCCCGGC TCCAGGGCCG

CGAACGGCGC ATCCTTCCCA TCGCGCTGGC CCATGATGCG GCGGGCTTCT GGGCCGATCA 2100
GCTTGCGCCG TAGGAAGGGT AGCGCGACCG GGTACTACGC CGCCCGAAGA CCCGGCTAGT

CGCGGGGGGG CCTGTTCCCG TGGGACTGCG CGCGGGGTTC TTTCATCCGG TCACCGGCTA 2160
GCGCCGGCCC GGACAAGGGC ACCCTGACGC GCGCCCCAAG AAAGTAGGCC AGTGGCCGAT

TTCGCTGCCA TATGCGGCAC AGGTGGCGGA CGTGGTGGCG GGTCTGTCCG GGCGGGGGGG 2220
AAGCGACGGG ATACGGCGTG TCCACCGCCT GCACCCACCGC CCAGACAGGC CGGGCGGGCC

CACCGACGCG CTGCGCGGCG CCATCCGCGA TTACCGGATC GACCGGGCGC GCGCGACCG 2280
GTGGCTGCGC GACGCGCCGC GGTAGGCGCT AATGCGCTAG CTGGCCCGCG CGGCGCTGGC

CTTCTGCGC CTTTGAACC GGATGCTGTT CCGCGGCTGC GCGCCCGACC GGCGCTATAAC 2340
GAAAGACGCG GAAAACTTGG CCTACGACAA GGCGCCGACG CGCGGGCTGG CGCGCATATG

CCTGCTGCAG CGGTTCTACC GCATGCCGCA TGGACTGATC GAACGGTTCT ATGCCGGCG 2400
GGACGACGTC GCCAAGATGG CGTACGGCGT ACCTGACTAG CTTGCCAAGA TACGGCCGGC

GCTGAGCGTG GCGGATCAGC TGCGCATCGT GACCGGCAAG CCTCCCATTC CCCTTGGCAC 2460
CGACTCGCAC CGCCTAGTCG ACGCGTAGCA CTGGCCGTTG GGAGGGTAAG GGGAACCGTG

GGCCATCCGC TGCCTGCCCG AACGTCCCT GCTGAAGGAA AACGCATGAA CGCCCATTCG 2520
CCGGTAGGCG ACGGACGGGC TTGCAGGGGA CGACTTCCTT TTGCGTACTT GCGGGTAAGC

CCCGCGGCCA AGACCGCCAT CGTGATCGGC GCAGGCTTTG GCGGGCTGGC CCTGGCCATC 2580
GGGCGCCGGT TCTGGCGGT A GCACTAGCCG CGTCCGAAAC CGCCCGACCG GGACCGGTAG

CGCCTGCAGT CGCGGGGCAT CGCCACCAAC CTGGTCGAGG CCCGGGACAA GCGGGGGCGGG 2640
GCGGACGTCA GGCGCCCGTA GCGGTGGTGG GACCAGCTCC GGGCCCTGTT CGGGCCGGCC

CGCGCCTATG TCTGGCACGA TCAGGGCCAT CTCTTCGACG CGGGCCCGAC CGTCATCACC 2700
GCGCGGATAAC AGACCGTGCT AGTCCCGTA GAGAACGTCG GCGCGGGCTG GCAGTAGTGG

GACCCCGATG CGCTGAAAGA GCTGTGGGCC CTGACCGGGC AGGACATGGC GCGCGACGTG 2760
CTGGGGCTAC GCGACTTCT CGACACCCGG GACTGGCCCG TCCTGTACCG CGCGCTGCAC

ACGCTGATGC CGGTCTCGCC CTTCTATCGG CTGATGTGGC CGGGCGGGAA GGTCTTCGAT 2820
TCCGACTACG GCCAGAGCGG GAAGATAGCC GACTACACCG GCCCGCCCTT CCAGAAGCTA

TACGTGAACG AGGCCGATCC AGGGTCTGGG TCTTGCCGTG CCAGGTGAAG CTGTTGCCGT 2880
ATGCACTTGC TCCGGCTAGG TCCCAGACCC AGAACGGCAC GGTCCACTTC GACAACGGCA

GGATCC 2886

CCTAGG

配列番号：5

配列の長さ：729

配列の型：鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：Alcaligenes

株名：sp. PC-1

配列

ATG	TCC	GGA	CGG	AAG	CCT	GGC	ACA	ACT	GGC	GAC	ACG	ATC	GTC	AAT	CTC	48
Met	Ser	Gly	Arg	Lys	Pro	Gly	Thr	Thr	Gly	Asp	Thr	Ile	Val	Asn	Leu	
1	5											10		15		
GGT	CTG	ACC	GCC	GCG	ATC	CTG	CTG	TGC	TGG	CTG	GTC	CTG	CAC	GCC	TTT	96
Gly	Leu	Thr	Ala	Ala	Ile	Leu	Leu	Cys	Trp	Leu	Val	Leu	His	Ala	Phe	
												20		30		
ACG	CTA	TGG	TTG	CTA	GAT	GCG	GCC	GCG	CAT	CCG	CTG	CTT	GCC	GTG	CTG	144
Thr	Leu	Trp	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	His	Pro	Leu	Leu	Ala	Val	Leu		
												35		45		
TGC	CTG	GCT	GGG	CTG	ACC	TGG	CTG	TCG	GTC	GGG	CTG	TTC	ATC	ATC	GCG	192
Cys	Leu	Ala	Gly	Leu	Thr	Trp	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Ala	
												50		60		

CAT	GAC	GCA	ATG	CAC	GGG	TCC	GTG	GTG	CCG	GGG	CCG	CGC	GCC	AAT	240	
His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Ser	Val	Val	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Asn	
65				70				75				80				
GCG	GCG	ATC	GGG	CAA	CTG	GCG	CTG	TGG	CTC	TAT	GCG	GGG	TTC	TCG	TGG	288
Ala	Ala	Ile	Gly	Gln	Leu	Ala	Leu	Trp	Leu	Tyr	Ala	Gly	Phe	Ser	Trp	
				85				90				95				
CCC	AAG	CTG	ATC	GCC	AAG	CAC	ATG	ACG	CAT	CAC	CGG	CAC	GCC	GGC	ACC	336
Pro	Lys	Leu	Ile	Ala	Lys	His	Met	Thr	His	His	Arg	His	Ala	Gly	Thr	
100				105				110								
GAC	AAC	GAT	CCC	GAT	TTC	GGT	CAC	GGA	GGG	CCC	GTG	CGC	TGG	TAC	GGC	384
Asp	Asn	Asp	Pro	Asp	Phe	Gly	His	Gly	Gly	Pro	Val	Arg	Trp	Tyr	Gly	
115				120				125								
AGC	TTC	GTC	TCC	ACC	TAT	TTC	GGC	TGG	CGA	GAG	GGA	CTG	CTG	CTA	CCG	432
Ser	Phe	Val	Ser	Thr	Tyr	Phe	Gly	Trp	Arg	Glu	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	
130				135				140								
GTG	ATC	GTC	ACC	ACC	TAT	GGC	CTG	ATC	CTG	GGC	GAT	CGC	TGG	ATG	TAT	480
Val	Ile	Val	Thr	Thr	Tyr	Ala	Leu	Ile	Leu	Gly	Asp	Arg	Trp	Met	Tyr	
145				150				155				160				
GTC	ATC	TTC	TGG	CCG	GTC	CCG	GCC	GTT	CTG	GCG	TCG	ATC	CAG	ATT	TTC	528
Val	Ile	Phe	Trp	Pro	Val	Pro	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Ile	Gln	Ile	Phe	
165				170				175								
GTC	TTC	GGA	ACT	TGG	CTG	CCC	CAC	CGC	CCG	GGA	CAT	GAC	GAT	TTT	CCC	576
Val	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu	Pro	His	Arg	Pro	Gly	His	Asp	Asp	Phe	Pro	
180				185				190								

GAC CGG CAC AAC GCG AGG TCG ACC GGC ATC GGC GAC CCG TTG TCA CTA 624
Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu
195 200 205
CTG ACC TGC TTC CAT TTC GGC GGC TAT CAC CAC GAA CAT CAC CTG CAT 672
Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
210 215 220
CCG CAT GTG CCG TGG TGG CGC CTG CCT CGT ACA CGC AAG ACC GGA GGC 720
Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly
225 230 235 240
CGC GCA TGA 729
Arg Ala***

配列番号 : 6

配列の長さ : 489

配列の型 : 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源 :

生物名 : Alcaligenes

株名 : sp. PC-1

配列

ATG ACG CAA TTC CTC ATT GTC GTG GCG ACA GTC CTC GTG ATG GAG CTG 48

Met Thr Gin Phe Leu Ile Val Val Ala Thr Val Leu Val Met Glu Leu

5

10

15

ACC GCC TAT TCC GTC CAC CGC TGG ATT ATG CAC GGC CCC CTA GGC TGG 96

Thr Ala Tyr Ser Val His Arg Trp Ile Met His Gly Pro Leu Gly Trp

20

25

30

GGC TGG CAC AAG TCC CAT CAC GAA GAG CAC GAC CAC GCG TTG GAG AAG 144

Gly Trp His Lys Ser His His Glu Glu His Asp His Ala Leu Glu Lys

35

40

45

AAC GAC CTC TAC GGC GTC GTC TTC GCG GTG CTG GCG ACG ATC CTC TTC 192

Asn Asp Leu Tyr Gly Val Val Phe Ala Val Leu Ala Thr Ile Leu Phe

50

55

60

ACC GTG GGC GCC TAT TGG TGG CCG GTG CTG TGG TGG ATC GCC CTG GGC	240		
Thr Val Gly Ala Tyr Trp Trp Pro Val Leu Trp Trp Ile Ala Leu Gly			
65	70	75	80
ATG ACG GTC TAT GGG TTG ATC TAT TTC ATC CTG CAC GAC GGG CTT GTG	288		
Met Thr Val Tyr Gly Leu Ile Tyr Phe Ile Leu His Asp Gly Leu Val			
85	90	95	
CAT CAA CGC TGG CCG TTT CGG TAT ATT CCG CGG CGG GGC TAT TTC CGC	336		
His Gln Arg Trp Pro Phe Arg Tyr Ile Pro Arg Arg Gly Tyr Phe Arg			
100	105	110	
AGG CTC TAC CAA GCT CAT CGC CTG CAC CAC GCG GTC GAG GGG CGG GAC	384		
Arg Leu Tyr Gln Ala His Arg Leu His His Ala Val Glu Gly Arg Asp			
115	120	125	
CAC TGC GTC AGC TTC GGC TTC ATC TAT GCC CCA CCC GTG GAC AAG CTG	432		
His Cys Val Ser Phe Gly Phe Ile Tyr Ala Pro Pro Val Asp Lys Leu			
130	135	140	
AAG CAG GAT CTG AAG CGG TCG GGT GTC CTG CGC CCC CAG GAC GAG CGT	480		
Lys Gln Asp Leu Lys Arg Ser Gly Val Leu Arg Pro Gln Asp Glu Arg			
145	150	155	160
CCG TCG TGA			489
Pro Ser ***			

配列番号：7

配列の長さ：1631

配列の型：鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：Alcaligenes

株名：sp. PC-1

配列

CTGCAGGCCG GGCCCCGGTGG CCAATGGTCG CAACCGGCAG GACTGGAACA GGACGGCGGG 60

GACGTCCGGC CCGGGCCACC GGTTACCAGC GTTGGCCGTC CTGACCTTGT CCTGCCGCC

CCGGTCTAGG CTGTCGCCCT ACGCAGCAGG AGTTCCGGAT GTCCGGACGG AAGCCTGGCA 120

GGCCAGATCC GACACCGGGA TGCCTCGTCC TCAAAGCCTA CAGGGCTGCC TTGGGACCGT

CAACTGGCGA CACGATCGTC AATCTCGGTC TGACCCGCCGC GATCCTGCTG TGCTGGCTGG 180

GTTGACCGCT GTGCTAGCAG TTAGAGCCAG ACTGGCGGCG CTAGGACGAC ACGACCGACC

TCCTGCACGC CTTTACGCTA TGGTTGCTAG ATGCGGCCGC GCATCCGCTG CTTGCCGTGC 240

AGGACGTGCG GAAATGCCAT ACCAACGATC TACGCCGGCG CGTAGGCGAC GAACGGCACG

TGTGCCTGGC TGGGCTGACC TGGCTGTCGG TCGGGCTGTT CATCATCGCG CATGACCGAA 300
ACACGGACCG ACCCGACTGG ACCGACAGCC AGCCCCACAA GTACTAGCGC GTACTGCGTT

TGCACGGGTC CGTGGTGCCG GGGCGGCCGC GCGCCAATGC GCGGATCGGG CAACTGGCGC
ACGTGCCAG GCACCACGGC CCCGCCGGCG CGCGGTTACG CCGCTAGCCC GTTGACCGCG 360

TGTGGCTCTA TGCAGGGTTC TCGTGGCCA AGCTGATCGC CAAGCACATG ACGCATCACC 420
ACACCGAGAT ACGCCCCAAG AGCACCGGGT TCGACTAGCG GTTCGTGTAC TCGTAGTGG

GGCACGCCGG CACCGACAAC GATCCCATT TCGGTACCG AGGGCCCGTG CGCTGGTACG 480
CCGTGCGGCC GTGGCTGTTG CTAGGGCTAA AGCCAGTGCC TCCCGGGCAC GCGACCATGC

GCAGCTTCGT CTCCACCTAT TTCCGGCTGGC GAGAGGGACT GCTGCTACCG GTGATCGTCA 540
CGTCGAAGCA GAGGTGGATA AAGCCGACCG CTCTCCCTGA CGACGATGGC CACTAGCACT

CCACCTATGC GCTGATCCTG GGCGATCGCT GGATGTATGT CATTTCTGG CCGGTCCCCG 600
GGTGGATAACG CGACTAGGAC CCGCTAGCGA CCTACATACA GTAGAAGACC GGCCAGGGCC

CCGTTCTGGC GTCGATCCAG ATTTCTGTCT TCGGAACCTTG GCTGCCCAÇ CGCCCGGGAC 660
GGCAAGACCG CAGCTAGGTC TAAAAGCAGA AGCCTTGAAC CGACGGGGTG GCGGGCCCTG

ATGACGATT TCCCACCGG CACAACCGA GGTGACCCGG CATCGGGAC CCGTTGTAC 720
TACTGCTAAA AGGGCTGGCC GTGTTGCGCT CCAGCTGGCC GTAGCCGCTG GGCAACAGTG

TACTGACCTG CTTCCATTTC GGCGGCTATC ACCACGAACA TCACCTGCAT CCGCATGTGC 780
ATGACTGGAC GAAGGTAAAG CCGCCGATAG TGGTCTTGT AGTGGACGTA GGCACACCG

CGTGGTGGCG CCTGCCCTCGT ACACGCAAGA CCGGAGGCCG CGCATGACGC AATTCCCTAT 840
GCACCAACCGC GGACGGAGCA TGTGCGTCT GGCCCTCCGGC GCGTACTGCG TTAAGGAGTA

TGTCGTGGCG ACAGTCCTCG TGATGGAGCT GACCGCCTAT TCCGTCCACC GCTGGATTAT 900
ACAGCACCGC TGTCAGGAGC ACTACCTCGA CTGGCGGATA AGGCAGGTGG CGACCTAATA

GCACGGCCCC CTAGGCTGGG GCTGGCACAA GTCCCATCAC GAAGAGCACG ACCACGCCCT 960
CGTGCCGGGG GATCCGACCC CGACCGTGT CAGGGTAGTG CTTCTCGTGC TGGTGCCTAA

GGAGAAGAAC GACCTCTACG CGCTCGTCTT CGCGGTGCTG GCGACCGATCC TCTTCACCGT 1020
CCTCTTCTTG CTGGAGATGC CGCAGCAGAA GCGCCACGAC CGCTGCTAGG AGAAAGTGGCA

GGGGCCCTAT TGGTGGCCGG TGCTGTGGTG GATGCCCTG GGCATGACGG TCTATGGTT 1080
CCCGCGGATA ACCACCGGCC ACGACACCCAC CTAGCGGGAC CGCTACTGCC AGATAACCAA

GATCTATTTC ATCCTGCACG ACGGGCTTGT GCATCAACGC TGGCCGTTTC GGTATATTCC 1140
CTAGATAAAAG TAGGACGTGC TGGCCGAACA CGTAGTTGCG ACCGGCAAAG CCATATAAGG

GGGGCGGGGC TATTTCGGCA GGCTCTACCA AGCTCATCGC CTGCACCCACG CGGTCGAGGG 1200
CGCCGCCCCG ATAAAGGCCT CCGAGATGGT TCGAGTAGCG GACGTGGTGC GCCAGCTCCC

GGGGGACAC TGCAGCT TCGGCTTCAT CTATCCCCA CCCGTGGACA AGCTGAAGCA 1260
CGCCCTGGTG ACCCAGTCGA AGCCGAAGTA GATACTGGGT GGGCACCTGT TCGACTTCGT

GGATCTGAAG CGGTGGGTG TCCCTGCGCC CCAGGACGAG CGTCCGTCGT GATCTCTGAT 1320
CCTAGACTTC GCCAGCCCCAC AGGACGCCGGG GGTCCCTGCTC GCAGGCAGCA CTAGACACTA

CCCCGGGTGG CCGCATGAAA TCCGACGTGC TGCTGGCAGG GGCCGGCCTT GCCAACGGAC 1380
GGGCCGCACC GGCGTACTTT AGGCTGCACG ACGACCGTCC CCGGCCCCGAA CGGTTGCCCTG

TGATCGCGCT GGCGATCCGC AAGGCGCGC CCGACCTTCG CGTCTGCTG CTGGACCGTG 1440
ACTAGCGCGA CCGCTAGGCG TTCCGCGCCG GGCTGGAAGC GCACGACGAC GACCTGGCAC

CGGCGGGCGC CTCGGACGGG CATACTGGT CCTGCCACGA CACCGATTTG GCGCCGCACT 1500
GCCGCCCGCG GAGCCTGCCG GTATGAACCA GGACGGTGCT GTGGCTAAC CGCGGGGTGA

GGCTGGACCG CCTGAAGCCG ATCAGGCCTG GCGACTGGCC CGATCAGGAG GTGCGGTTCC 1560
CCGACCTGGC GGACTTCGGC TAGTCCGCAC CGCTGACCGG GCTAGTCCTC CACGCCAAGG

CAGACCATTC GCGAAGGCTC CGGGCCGGAT ATGGCTCGAT CGACGGGCGG GGGCTGATGC 1620
GTCTGGTAAG CGCTTCCGAG GCCCGGCCTA TACCGAGCTA GCTGCCCCGCC CCCGACTACG

GTGCGGTGAC C
CACGCCACTG G

1631

請求の範囲

1. β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。
2. β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。
3. 請求の範囲第2項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第2項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。
4. β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。
5. 請求の範囲第4項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第4項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。
6. β -カロチンをエキネノンを経てカンタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212ま

でのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

7. 請求の範囲第6項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第6項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

8. β -カルチオンをエキネノンを経てカンタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

9. 請求の範囲第8項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第8項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

10. 3-ヒドロキシ- β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

11. 3-ヒドロキシ- β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

12. 請求の範囲第11項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第11項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する

DNA鎖。

13. 3-ヒドロキシ- β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

14. 請求の範囲第13項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第13項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

15. ゼアキサンチンを4-ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示したアミノ酸番号1から212までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

16. 請求の範囲第15項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第15項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

17. ゼアキサンチンを4-ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンに変換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号5に示したアミノ酸番号1から242までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

18. 請求の範囲第17項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第17項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

19. 4-ケト- β -イオノン環の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

20. 4-ケト- β -イオノン環の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号2に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

21. 請求の範囲第20項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第20項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

22. 4-ケト- β -イオノン環の3位の炭素に1つの水酸基を付加する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号6に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

23. 請求の範囲第22項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第22項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する

DNA鎖。

24. カンタキサンチンをフェニコキサンチンを経てアスタキサンチンに転換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号2に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

25. 請求の範囲第24項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第24項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

26. カンタキサンチンをフェニコキサンチンを経てアスタキサンチンに転換する酵素活性を有していてアミノ酸配列が実質的に配列番号6に示したアミノ酸番号1から162までのアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

27. 請求の範囲第26項に記載のDNA鎖にハイブリダイズし、かつ請求の範囲第26項に記載の酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNA鎖。

28. 請求の範囲第1～9項のいずれか1の範囲第に記載のDNA鎖を、 β -カロチンを產生する能力を有する微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物からカンタキサンチンまたはエキネノンを採取することを特徴とする、キサントフィルの製造法。

29. 請求の範囲第10～18項のいずれか1の範囲第に記載のDNA鎖を、ゼアキサンチンを產生する能力を有する微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物からアスタキサンチンまたは4-ケトゼアキサンチンを採取することを特徴とする、キサントフィルの製造法。

30. 請求の範囲第19～27項のいずれか1の範囲第に記載のDNA鎖を、カンタキサンチンを產生する能力を有する微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物からアスタキサンチンまたはフェニコキサンチンを採取することを特徴とする、キサントフィルの製造法。

31. 微生物が細菌または酵母である、請求の範囲第28～30項のいずれか1の範囲第に記載の製造法。

A



237 246 255 264 273 282
 GTG CAT GCG CTG TGG TTT CTG GAC GCA GCG GCG CAT CCC ATC CTG GCG ATC GCA
 Met His Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala

 291 300 309 318 327 336
 AAT TTC CTG GGG CTG ACC TGG CTG TCG GTC GGA TTG TTC ATC ATC GCG CAT GAC
 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp

 345 354 363 372 381 390
 GCG ATG CAC GGG TCG GTG GTG CCG GGG CGT CCG CGC GCC AAT GCG GCG ATG GGC
 Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Met Gly

 399 408 417 426 435 444
 CAG CTT GTC CTG TGG CTG TAT GCC GGA TTT TCG TGG CGC AAG ATG ATC GTC AAG
 Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Arg Lys Met Ile Val Lys

 453 462 471 480 489 498
 CAC ATG GCC CAT CAC CGC CAT GCC GGA ACC GAC GAC CCC GAT TTC GAC CAT
 His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His

 507 516 525 534 543 552
 GGC GGC CCG GTC CGC TGG TAC GCC CGC TTC ATC GGC ACC TAT TTC GGC TGG CGC
 Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg

 561 570 579 588 597 606
 GAG GGG CTG CTG CTG CCC GTC ATC GTG ACG GTC TAT GCG CTG ATC CTT GGG GAT
 Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp

 615 624 633 642 651 660
 CGC TGG ATG TAC GTG GTC TTC TGG CCG CTG CCG TCG ATC CTG GCG TCG ATC CAG
 Arg Trp Met Tyr Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln

 669 678 687 696 705 714
 CTG TTC GTG TTC GGC ACC TGG CTG CCG CAC CGC CCC GGC CAC GAC GCG TTC CCG
 Leu Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro

 723 732 741 750 759 768
 GAC CGC CAC AAT GCG CGG TCG TCG CGG ATC AGC GAC CCC GTG TCG CTG CTG ACC
 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu Leu Thr

 777 786 795 804 813 822
 TGC TTT CAC TTT GGC GGT TAT CAT CAC GAA CAC CAC CTG CAC CCG ACG GTG CCG
 Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His Pro Thr Val Pro

 831 840 849 858 867
 TGG TGG CGC CTG CCC AGC ACC CGC ACC AAG GGG GAC ACC GCA TGA
 Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp Thr Ala ***



B

F I G. I

C



872 881 890 899 908 917
 ATG ACC AAT TTC CTG ATC GTC GTC GCC ACC GTG CTG GTG ATG GAG TTG ACG GCC
 Met Thr Asn Phe Leu Ile Val Val Ala Thr Val Leu Val Met Glu Leu Thr Ala

 926 935 944 953 962 971
 TAT TCC GTC CAC CGC TGG ATC ATG CAC GGC CCC CTG GGC TGG CGC TGG CAC AAG
 Tyr Ser Val His Arg Trp Ile Met His Gly Pro Leu Gly Trp Gly Trp His Lys

 980 989 998 1007 1016 1025
 TCC CAC CAC GAG GAA CAC GAC CAC GCG CTG GAA AAG AAC GAC CTG TAC GGC CTG
 Ser His His Glu His Asp His Ala Leu Glu Lys Asn Asp Leu Tyr Gly Leu

 1034 1043 1052 1061 1070 1079
 GTC TTT GCG GTG ATC GCC ACG GTG CTG TTC ACG GTG GGC TGG ATC TGG GCG CCG
 Val Phe Ala Val Ile Ala Thr Val Leu Phe Thr Val Gly Trp Ile Trp Ala Pro

 1088 1097 1106 1115 1124 1133
 GTC CTG TGG TGG ATC GCC TTG GGC ATG ACT GTC TAT GGG CTG ATC TAT TTC GTC
 Val Leu Trp Trp Ile Ala Leu Gly Met Thr Val Tyr Gly Leu Ile Tyr Phe Val

 1142 1151 1160 1169 1178 1187
 CTG CAT GAC GGG CTG GTG CAT CAG CGC TGG CCG TTC CGT TAT ATC CCG CGC AAG
 Leu His Asp Gly Leu Val His Gln Arg Trp Pro Phe Arg Tyr Ile Pro Arg Lys

 1196 1205 1214 1223 1232 1241
 GGC TAT GCC AGA CGC CTG TAT CAG GCC CAC CGC CTG CAC CAT GCG GTC GAG GGG
 Gly Tyr Ala Arg Arg Leu Tyr Gln Ala His Arg Leu His Ala Val Glu Gly

 1250 1259 1268 1277 1286 1295
 CGC GAC CAT TGC GTC AGC TTC GGC TTC ATC TAT GCG CCC CCG GTC GAC AAG CTG
 Arg Asp His Cys Val Ser Phe Gly Phe Ile Tyr Ala Pro Pro Val Asp Lys Leu

 1304 1313 1322 1331 1340 1349
 AAG CAG GAC CTG AAG ATG TCG GGC GTG CTG CGG GCC GAG GCG CAG GAG CGC ACG
 Lys Gln Asp Leu Lys Met Ser Gly Val Leu Arg Ala Glu Ala Gln Glu Arg Thr

TGA

D

F I G. 2

E

↓

1357 1366 1375 1384 1393 1402
 GTG ACC CAT GAC GTG CTG CTG GCA GGG GCG GGC CTT GCC AAC GGG CTG ATC GCC
 Met Thr His Asp Val Leu Leu Ala Gly Ala Gly Leu Ala Asn Gly Leu Ile Ala

 1411 1420 1429 1438 1447 1456
 CTG GCG CTG CGC GCG CGG CCC GAC CTG CGC GTG CTG CTG GAC CAT GCC
 Leu Ala Leu Arg Ala Ala Arg Pro Asp Leu Arg Val Leu Leu Asp His Ala

 1465 1474 1483 1492 1501 1510
 GCA GGA CCG TCA GAC GGC CAC ACC TGG TCC TGC CAC GAC CCC GAC CTG TCG CCG
 Ala Gly Pro Ser Asp Gly His Thr Trp Ser Cys His Asp Pro Asp Leu Ser Pro

 1519 1528 1537 1546 1555 1564
 GAC TGG CTG GCG CGG CTG AAG CCC CTG CGC CGC GCC AAC TGG CCC GAC CAG GAG
 Asp Trp Leu Ala Arg Leu Lys Pro Leu Arg Arg Ala Asn Trp Pro Asp Gln Glu

 1573 1582 1591 1600 1609 1618
 GTG CGC TTT CCC CGC CAT GCC CGG CGG CTG GCC ACC GGT TAC GGG TCG CTG GAC
 Val Arg Phe Pro Arg His Ala Arg Arg Leu Ala Thr Gly Tyr Gly Ser Leu Asp

 1627 1636 1645 1654 1663 1672
 GGG GCG GCG CTG GCG GAT GCG GTG GTC CGG TCG GGC GCC GAG ATC CGC TGG GAC
 Gly Ala Ala Leu Ala Asp Ala Val Val Arg Ser Gly Ala Glu Ile Arg Trp Asp

 1681 1690 1699 1708 1717 1726
 AGC GAC ATC GCC CTG CTG GAT GCG CAG GGG GCG ACG CTG TCC TGC GGC ACC CGG
 Ser Asp Ile Ala Leu Leu Asp Ala Gln Gly Ala Thr Leu Ser Cys Gly Thr Arg

 1735 1744 1753 1762 1771 1780
 ATC GAG GCG GGC GCG GTC CTG GAC GGG CGG GGC GCG CAG CCG TCG CGG CAT CTG
 Ile Glu Ala Gly Ala Val Leu Asp Gly Arg Gly Ala Gln Pro Ser Arg His Leu

 1789 1798 1807 1816 1825 1834
 ACC GTG GGT TTC CAG AAA TTC GTG GGT GTC GAG ATC GAG ACC GAC CGC CCC CAC
 Thr Val Gly Phe Gln Lys Phe Val Gly Val Glu Ile Glu Thr Asp Arg Pro His

 1843 1852 1861 1870 1879 1888
 GGC GTG CCC CGC CCG ATG ATC ATG GAC GCG ACC GTC ACC CAG CAG GAC GGG TAC
 Gly Val Pro Arg Pro Met Ile Met Asp Ala Thr Val Thr Gln Gln Asp Gly Tyr

 1897 1906 1915 1924 1933 1942
 CGC TTC ATC TAT CTG CTG CCC TTC TCT CCG ACG CGC ATC CTG ATC GAG GAC ACG
 Arg Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Phe Ser Pro Thr Arg Ile Leu Ile Glu Asp Thr

 1951 1960 1969 1978 1987 1996
 CGC TAT TCC GAT GGC GGC GAT CTG GAC GAC GAC GCG CTG GCG GCG TCC CAC
 Arg Tyr Ser Asp Gly Gly Asp Leu Asp Asp Ala Leu Ala Ala Ser His

FIG. 3

3 / 20

2005	2014	2023	2032	2041	2050
GAC TAT GCC CGC CAG CAG GGC TGG ACC GGG GCC GAG GTC CGG CGC GAA CGC GGC					
Asp Tyr Ala Arg Gln Gln Gly Trp Thr Gly Ala Glu Val Arg Arg Glu Arg Gly					
2059	2068	2077	2086	2095	2104
ATC CTT CCC ATC GCG CTG GCC CAT GAT GCG GCG GGC TTC TGG GCC GAT CAC GCG					
Ile Leu Pro Ile Ala Leu Ala His Asp Ala Ala Gly Phe Trp Ala Asp His Ala					
2113	2122	2131	2140	2149	2158
GCG GGG CCT GTT CCC GTG GGA CTG CGC GCG GGG TTC TTT CAT CCG GTC ACC GGC					
Ala Gly Pro Val Pro Val Gly Leu Arg Ala Gly Phe Phe His Pro Val Thr Gly					
2167	2176	2185	2194	2203	2212
TAT TCG CTG CCC TAT GCG GCA CAG GTG GCG GAC GTG GTG GCG GGT CTG TCC GGG					
Tyr Ser Leu Pro Tyr Ala Ala Gln Val Ala Asp Val Val Ala Gly Leu Ser Gly					
2221	2230	2239	2248	2257	2266
CCG CCC GGC ACC GAC GCG CTG CGC GGC GCC ATC CGC GAT TAC GCG ATC GAC CGG					
Pro Pro Gly Thr Asp Ala Leu Arg Gly Ala Ile Arg Asp Tyr Ala Ile Asp Arg					
2275	2284	2293	2302	2311	2320
GCG CGC CGC GAC CGC TTT CTG CGC CTT TTG AAC CGG ATG CTG TTC CGC GGC TGC					
Ala Arg Arg Asp Arg Phe Leu Arg Leu Leu Asn Arg Met Leu Phe Arg Gly Cys					
2329	2338	2347	2356	2365	2374
GCG CCC GAC CGG CGC TAT ACC CTG CTG CAG CGG TTC TAC CGC ATG CCG CAT GGA					
Ala Pro Asp Arg Arg Tyr Thr Leu Leu Gln Arg Phe Tyr Arg Met Pro His Gly					
2383	2392	2401	2410	2419	2428
CTG ATC GAA CGG TTC TAT GCC GGC CGG CTG AGC GTG GCG GAT CAG CTG CGC ATC					
Leu Ile Glu Arg Phe Tyr Ala Gly Arg Leu Ser Val Ala Asp Gln Leu Arg Ile					
2437	2446	2455	2464	2473	2482
GTG ACC GGC AAG CCT CCC ATT CCC CTT GGC ACG GCC ATC CGC TGC CTG CCC GAA,					
Val Thr Gly Lys Pro Pro Ile Pro Leu Gly Thr Ala Ile Arg Cys Leu Pro Glu					
2491	2500	2509			
CGT CCC CTG CTG AAG GAA AAC GCA TGA					
Arg Pro Leu Leu Lys Glu Asn Ala ***					

↑
F

F I G. 4

10	20	30	40	50	60	
GGATC CGGCG ACCTT GCGGC GCTGC GCCGC GCGCC TTTGC TGGTG CCTGG GCCGG GTGGC						
CCTAG GCCGC TGGAA CGCCG CGACG CGGGC CGCGG AAACG ACCAC GGACC CGGGC CACCG						
	70	80	90	100	110	120
CAATG GTCGC AAGCA ACGGG GATGG AAACC GGCGA TGCGG GACTG TAGTC TGCGC GGATC						
GTTAC CAGCG TTCGT TGCCC CTACC TTTGG CCGCT ACGCC CTGAC ATCAG ACGCG CCTAG						
	130	140	150	160	170	180
GCCGG TCCGG GGGAC AAGAT GAGCG CACAT GCCCT GCCCA AGGCA GATCT GACCG CCACC						
CGGCC AGGCC CCCTG TTCTA CTCGC GTGTA CGGGA CGGGT TCCGT CTAGA CTGGC GGTGG						
	190	200	210	220	A 230	240
AGCCT GATCG TCTCG GGCGG CATCA TCGCC GCTTG GCTGG CCCTG CATGT GCATG CGCTG						
TCGGA CTAGC AGAGC CCGCC GTAGT AGCGG CGAAC CGACC GGGAC GTACA CGTAC GCGAC						
	250	260	270	280	290	300
TGGTT TCTGG ACGCA GCGGC GCATC CCATC CTGGC GATCG CAAAT TTCTT GGGGC TGACC						
ACCAA AGACC TCGGT CGCCG CGTAG GGTAG GACCG CTAGC GTTTA AAGGA CCCCCG ACTGG						
	310	320	330	340	350	360
TGGCT GTCGG TCGGA TTGTT CATCA TCGCG CATGA CGCGA TGCAC GGGTC GGTGG TGCCG						
ACCGA CAGCC AGCCT AACAA GTAGT AGCGC GTACT GCGCT ACGTG CCCAG CCACC ACGGC						
	370	380	390	400	410	420
GGGCG TCCGC GCGCC AATGC GGCGA TGGGC CAGCT TGTCC TGTGG CTGTA TGCCG GATTT						
CCCAG AGGCG CGCGG TTACG CCGCT ACCCG GTCGA ACAGG ACACC GACAT ACGGC CTAAA						
	430	440	450	460	470	480
TCGTG GCGCA AGATG ATCGT CAAGC ACATG GCGCA TCACC GCGAT GCGGG AACCG ACGAC						
AGCAC CGCGT TCTAC TAGCA GTTCG TGTAC CGGGT AGTGG CGGTA CGGCC TTGGC TGCTG						
	490	500	510	520	530	540
GACCC CGATT TCGAC CATGG CGGCC CGGTC CGCTG GTACG CCCGC TTCAT CGGCA CCTAT						
CTGGG GCTAA AGCTG GTACC GCCGG GCCAG GCGAC CATGC GGGCG AAGTA GCGGT GGATA						
	550	560	570	580	590	600
TTCGG CTGGC GCGAG GGGCT GCTGC TGCCC GTCAT CGTGA CGGTC TATGC GCTGA TCCTT						
AAGCC GACCG CGCTC CCCGA CGACG ACGGG CAGTA GCACT GCCAG ATACG CGACT AGGAA						
	610	620	630	640	650	660
GGGGA TCGCT GGATG TACGT GGTCT TCTGG CGCGT GCGGT CGATC CTGGC GTCGA TCCAG						
CCCCT AGCGA CCTAC ATGCA CCAGA AGACC GGGCA CGGCA GCTAG GACCG CAGCT AGGTC						

670 680 690 700 710 720
 * * * * * *
 CTGTT CGTGT TCGGC ACCTG GCTGC CGCAC CGCCC CGGCC ACGAC GCGTT CCCGG ACCGG
 GACAA GCACA AGCGG TGGAC CGACG GCGTG GCGGG GCGGG TGCTG CGCAA GGGCC TGGCG

 730 740 750 760 770 780
 * * * * * *
 CACAA TGCAC GGTGG TCGCG GATCA GCGAC CCCGT GTCGC TGCTG ACCTG CTTTC ACTTT
 GTGTT ACGCG CCAGC AGCGC CTAGT CGCTG GGGCA CAGCG ACGAC TGGAC GAAAG TGAAA

 790 800 810 820 830 840
 * * * * * *
 GGCGG TTATC ATCAC GAACA CCACC TGCAC CCGAC GGTGG CGTGG TGGCG CCTGC CCAGC
 CCGCC AATAG TAGTG CTTGT GGTGG ACGTG GGCTG CCACG GCACC ACCGC GGACG GGTGG

 850 860 870 880 890 900
 * C * * * *
 ACCCG CACCA AGGGG GACAC CGCAT GACCA ATTTC CTGAT CGTCG TCGCC ACCGT GCTGG
 TGGGC GTGGT TCCCC CTGTG GCGTA CTGGT TAAAG GACTA GCAGC AGCGG TGGCA CGACC

 910 920 930 940 950 960
 * * B * * *
 TGATG GAGTT GACGG CCTAT TCCGT CCACC GCTGG ATCAT GCACG GCCCC CTGGG CTGGG
 ACTAC CTCAA CTGCC GGATA AGGCA GGTGG CGACC TAGTA CGTCG CGGGG GACCC GACCC

 970 980 990 1000 1010 1020
 * * * * * *
 GCTGG CACAA GTCCC ACCAC GAGGA ACACG ACCAC GCGCT GGAAA AGAAC GACCT GTACG
 CGACC GTGTT CAGGG TGGTG CTCCT TGTGC TGGTG CGCGA CCTTT TCTTG CTGGA CATGC

 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 * * * * * *
 GCCTG GTCTT TGCAG TGATC GCCAC GGTGC TGTTC ACGGT GGGCT GGATC TGGGC GCCGG
 CGGAC CAGAA ACGCC ACTAG CGGTG CCACG ACAAG TGCCA CCCGA CCTAG ACCCG CGGCC

 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 * * * * * *
 TCCTG TGGTG GATCG CCTTG GGCAT GACTG TCTAT GGGCT GATCT ATTTG GTCCT GCATG
 AGGAC ACCAC CTAGC GGAAC CCGTA CTGAC AGATA CCCGA CTAGA TAAAG CAGGA CGTAC

 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 * * * * * *
 ACGGG CTGGT GCATC AGCGC TGGCC GTTCC GTTAT ATCCC GCGCA AGGGC TATGC CAGAC
 TGCCC GACCA CGTAG TCGCG ACCGG CAAGG CAATA TAGGG CGCGT TCCCG ATACG GTCTG

 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 * * * * * *
 GCCTG TATCA GGCCC ACCGC CTGCA CCATG CGGTC GAGGG GCGCG ACCAT TGCCT CAGCT
 CGGAC ATAGT CCGGG TGGCG GACGT GGTAC GCCAG CTCCC CGCGC TGGTA ACGCA GTCGA

 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 * * * * * *
 TCGGC TTCAT CTATG CGCCC CCGGT CGACA AGCTG AAGCA GGACC TGAAG ATGTC GGGCG
 AGCCG AAGTA GATAC GCGGG GGCCA GCTGT TCGAC TTCGT CCTGG ACTTC TACAG CCCGC

1330 1340 **E** 1350 1360 1370 1380
 * * * * * *
 TGCTG CGGGC CGAGG CGCAG GAGCG CACGT GACCC ATGAC GTGCT GCTGG CAGGG GCGGG
 ACGAC GCCCC GCTCC GCGTC CTCGC GTGCA CTGGG TACTG CACGA CGACC GTCCC CGCCC
 * * * * * *
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 * * **D** * * *
 CCTTG CCAAC GGGCT GATCG CCCTG GCGCT GCGCG CGGGC CGACC TGGCG GTGCT
 GGAAC GGTTG CCCGA CTAGC GGGAC CGCGA CGCGC GCCGC GCCGG GCTGG ACGCG CACGA
 * * * * * *
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 * * * * * *
 GCTGC TGGAC CATGC CGCAG GACCG TCAGA CGGCC ACACC TGGTC CTGCC ACGAC CCCGA
 CGACG ACCTG GTACG GCGTC CTGGC AGTCT GCCGG TGTGG ACCAG GACGG TGCTG GGGCT
 * * * * * *
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 * * * * * *
 CCTGT CGCCG GACTG GCTGG CGCGG CTGAA GCCCC TGCGC CGCGC CAACT GGGCC GACCA
 GGACA GCGGC CTGAC CGACC GCGCC GACTT CGGGG ACGCG GCGGG GTTGA CCGGG CTGGT
 * * * * * *
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 * * * * * *
 GGAGG TGGCG TTTCC CGGCC ATGCC CGCGC GCTGG CCACC GGTAA CGGGT CGCTG GACGG
 CCTCC ACGCG AAAGG GGCAG TACGG GCCGC CGACC GGTGG CCAAT GCCCA GCGAC CTGCC
 * * * * * *
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 * * * * * *
 GGCAG CGCTG GCGGA TGCAG TGGTC CGGTC GGGCG CCGAG ATCCG CTGGG ACAGC GACAT
 CCGCC GCGAC CGCCT ACGCC ACCAG GCCAG CCCGC GGCTC TAGGC GACCC TGTGG CTGTA
 * * * * * *
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 * * * * * *
 CGCCC TGCTG GATGC GCAGG GGGCG ACGCT GTCTT GCGGC ACCCG GATCG AGGCG GCGCG
 GCGGG ACGAC CTACG CGTCC CCCGC TGCAG CAGGA CGCCG TGGGC CTAGC TCCGC CCGCG
 * * * * * *
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 * * * * * *
 GGTCC TGGAC GGGCG GGGCG CGCAG CGTC GCGGC ATCTG ACCGT GGGTT TCCAG AAATT
 CCAGG ACCTG CCCGC CCCGC GCGTC GCGAG CGCCG TAGAC TGGCA CCCAA AGGTC TTTAA
 * * * * * *
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 * * * * * *
 CGTGG GTGTC GAGAT CGAGA CCGAC CGCCC CCACG GCGTG CCCCC CCCGA TGATC ATGGA
 GCACC CACAG CTCTA GCTCT GGCTG GCGGG GGTGC CGCAC GGGGC GGGCT ACTAG TACCT
 * * * * * *
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 * * * * * *
 CGCGA CCGTC ACCCA GCAGG ACGGG TACCG CTTCA TCTAT CTGCT GCCCT TCTCT CCGAC
 GCGCT GGCAG TGGGT CGTCC TGCCC ATGGC GAAGT AGATA GACGA CGGGG AGAGA GGCTG
 * * * * * *
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 * * * * * *
 GCGCA TCCTG ATCGA GGACA CGCGC TATTC CGATG GCGGC GATCT GGACG ACGAC GCGCT
 CGCGT AGGAC TAGCT CCTGT GCGCG ATAAG GCTAC CGCCG CTAGA CCTGC TGCTG CGCGA

1990	2000	2010	2020	2030	2040
GGCGG CGGCG TCCCA CGACT ATGCC CGCCA GCAGG GCTGG ACCGG GGGCG AGGTC CGGCG CCGCC CCCGC AGGGT GCTGA TACGG GCGGT CGTCC CGACC TGGCC CCCGC TCCAG GCCGC					
2050	2060	2070	2080	2090	2100
CGAAC GCGGC ATCCT TCCCA TCGCG CTGGC CCATG ATGCG GCGGG CTCT GGGCC GATCA GCTTG CGCCG TAGGA AGGGT AGCGC GACCG GGTAC TACGC CGCCC GAAGA CCCGG CTAGT					
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CGCGG CGGGG CCTGT TCCCG TGGGA CTGCG CGCGG GGTTC TTTCA TCCGG TCACC GGCTA GCGCC GCCCC GGACA AGGGC ACCCT GACGC GCGCC CCAAG AAAGT AGGCC AGTGG CCGAT					
2170	2180	2190	2200	2210	2220
TTCGC TGCC C TATGC GGCAC AGGTG GCGGA CGTGG TGGCG GGTCT GTCCG GGCGG CCCGG AAGCG ACGGG ATACG CCGTG TCCAC CGCCT GCACC ACCGC CCAGA CAGGC CCGGC GGGCC					
2230	2240	2250	2260	2270	2280
CACCG ACGCG CTGCG CGCGC CCATC CGCGA TTACG CGATC GACCG GGCGC GCGGC GACCG GTGGC TGCAC GACGC GCGGC GGTAG GCGCT AATGC GCTAG CTGGC CGCGC CGCGC CTGGC					
2290	2300	2310	2320	2330	2340
CTTTC TGCAC CTTTT GAACC GGATG CTGTT CGCGC GCTGC GCGCC CGACC GGCGC TATAC GAAAG ACGCG GAAAA CTTGG CCTAC GACAA GGCGC CGACG CGCGG GCTGG CGCGC ATATG					
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CCTGC TGCAG CGGTT CTACC GCATG CCGCA TGGAC TGATC GAACG GTTCT ATGCC GGCGC GGACG ACGTC GCCAA GATGG CGTAC GGCCT ACCTG ACTAG CTTGC CAAGA TACGG CCGGC					
2410	2420	2430	2440	2450	2460
GCTGA CGGTG CGGGA TCAGC TGCGC ATCGT GACCG GCAAG CCTCC CATTC CCCTT GGCAC CGACT CGCAC CGCCT AGTCG ACGCG TAGCA CTGGC CGTTC GGAGG GTAAG GGGAA CCGTG					
2470	2480	2490	2500	2510	2520
GGCCA TCCGC TGCCT GCGCG AACGT CCCCT GCTGA AGGAA AACGC ATGAA CGCCC ATTG CCGGT AGGCG ACGGA CGGGC TTGCA GGGGA CGACT TCCTT TTGCG TACTT GCGGG TAAGC					
2530	2540	2550	2560	2570	2580
CCCGC GGCCA AGACC GCCAT CGTGA TCGGC GCAGG CTTTG GCGGG CTGGC CCTGG CCATC GGGCG CGGGT TCTGG CGGTA GCACT AGCCG CGTCC GAAAC CGCCC GACCG GGACC GGTAG					
2590	2600	2610	2620	2630	2640
CGCCT GCACT CGCGG GGCAT CGCCA CCACC CTGGT CGAGG CCCGG GACAA GCGCC GCGGG GCGGA CGTCA GGCAC CCGTA CGGGT GGTGG GACCA GCTCC GGGCC CTGTT CGGGC CGCCC					

2650	2660	2670	2680	2690	2700
*	*	*	*	*	*
CGCGC	CTATG	TCTGG	CACGA	TCAGG	GCCAT
CTCTT	CGACG	CGGGC	CCGAC	CGTCA	TCACC
GCGCG	GATAC	AGACC	GTGCT	AGTCC	CGGTA
GAGAA	GCTGC	GCCCCG	GGCTG	GCAGT	AGTGG
2710	2720	2730	2740	2750	2760
*	*	*	*	*	*
GACCC	CGATG	CGCTG	AAAGA	GCTGT	GGGCC
CTGAC	CGGGC	AGGAC	ATGGC	GCGCG	ACGTG
CTGGG	GCTAC	GCGAC	TTTCT	CGACA	CCCGG
GA	GA	GA	GA	GA	GA
2770	2780	2790	2800	2810	2820
*	*	*	*	*	*
ACGCT	GATGC	CGGTC	TCGCC	CTTCT	ATCGG
CTGAT	GTGGC	CGGGC	GGGAA	GGTCT	TCGAT
TGCGA	CTACG	GCCAG	AGCGG	GAAGA	TAGCC
GA	GA	GA	GA	GA	GA
2830	2840	2850	2860	2870	2880
*	*	*	*	*	*
TACGT	GAACG	AGGCC	GATCC	AGGGT	CTGGG
TCTTG	CCGTG	CCAGG	TGAAG	CTGTT	GCCGT
ATGCA	CTTGC	TCCGG	CTAGG	TCCCA	GACCC
GA	GA	GA	GA	GA	GA
2886					
*					
GGATC	C				
CCTAG	G				

FIG. 9

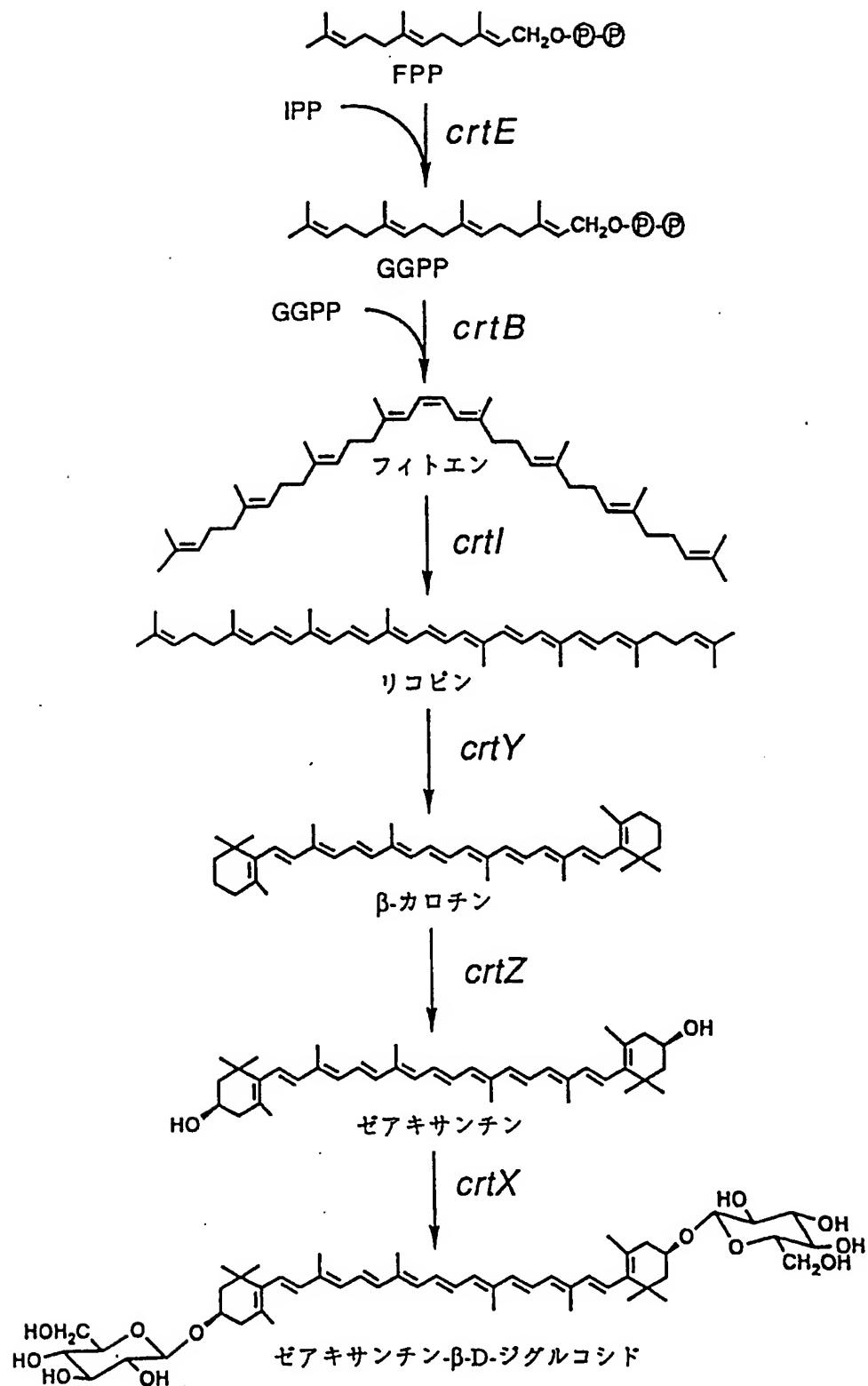


FIG. 10

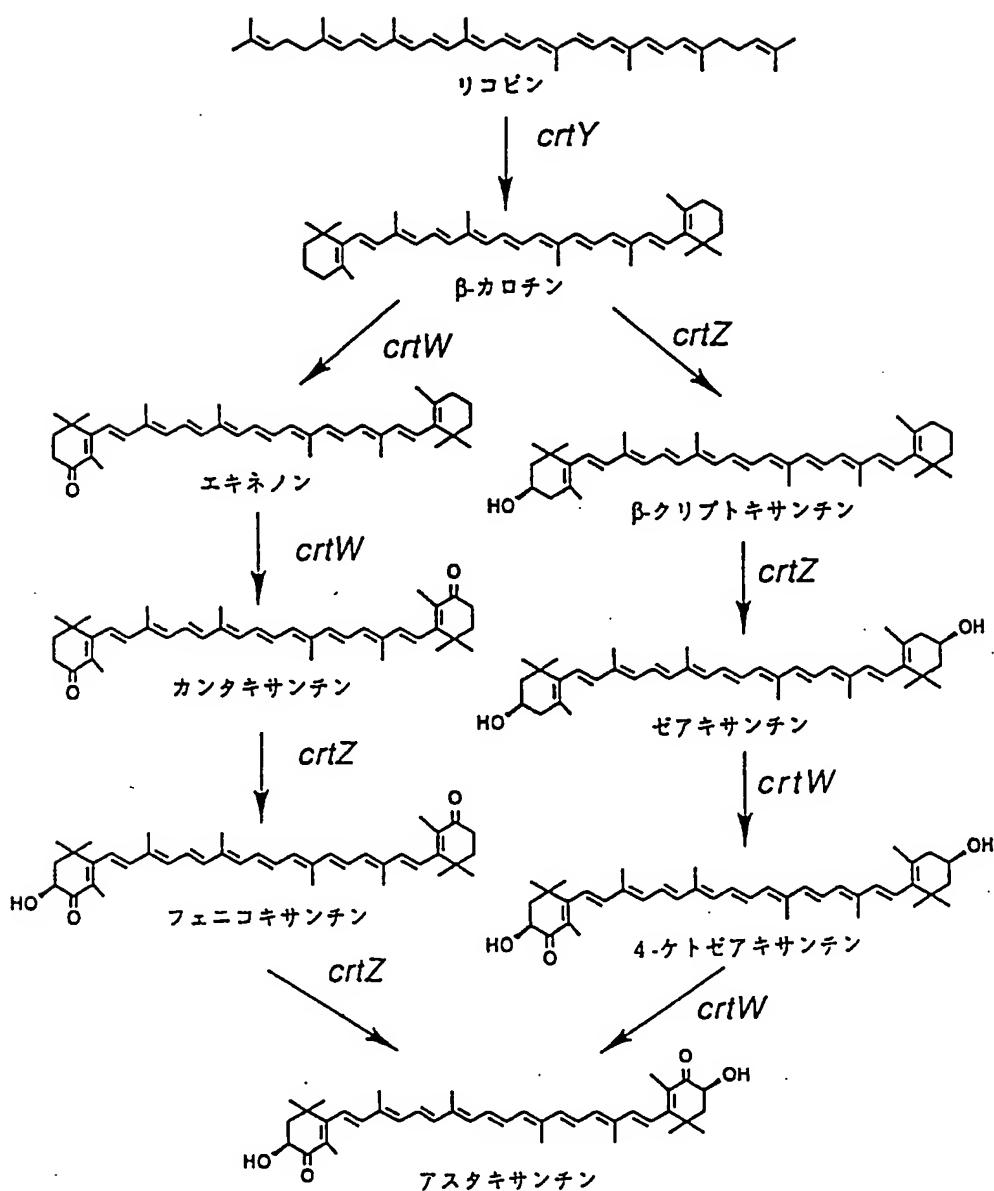


FIG. II

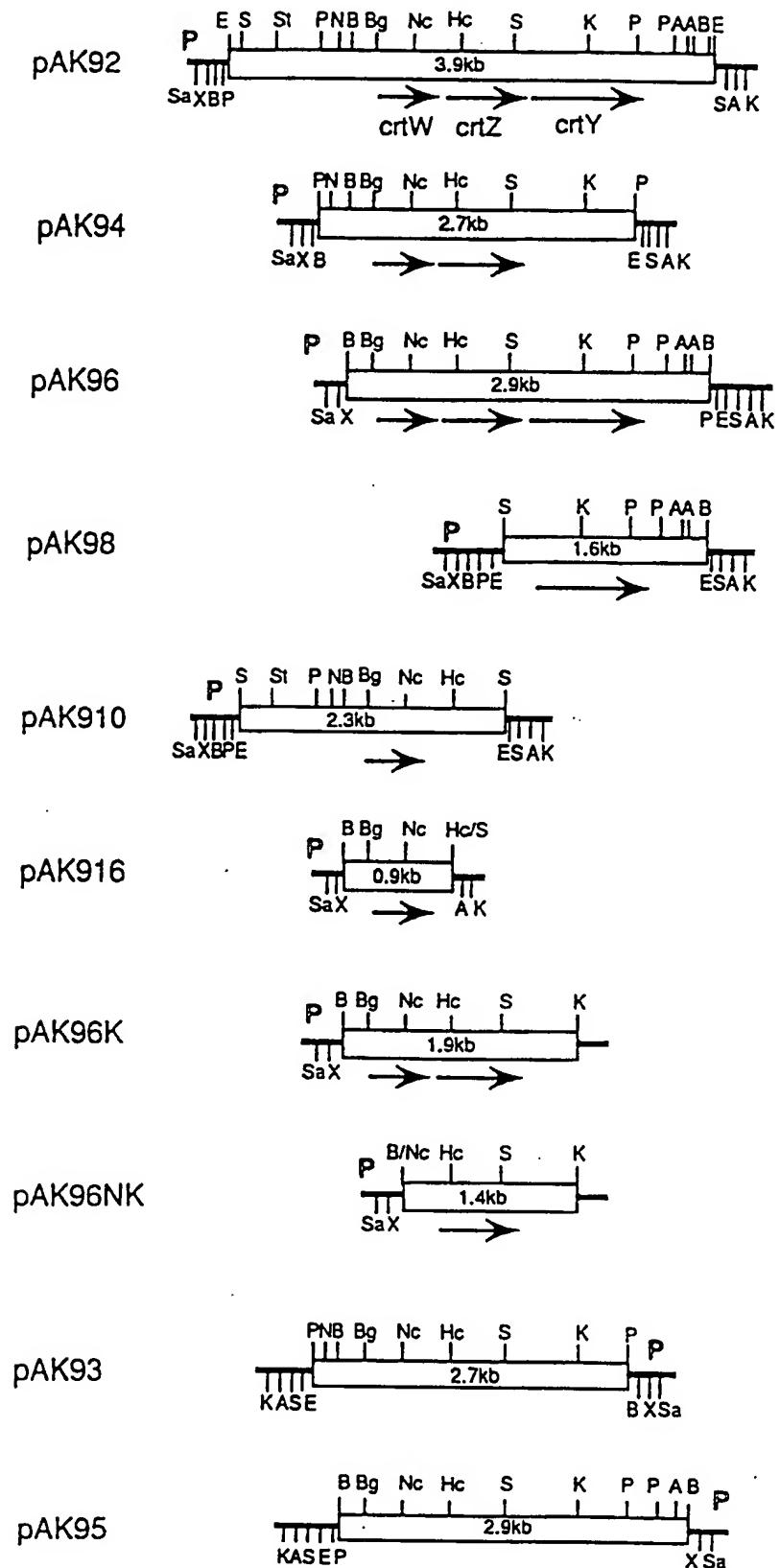


FIG. 12
12/20

A

110 120 130 140 150
 ATGTCGGGACGGAAGCCTGGCACAACTGGCGACACGATCGTCAATCTCGGTCTGACCGCC
 1 MetSerGlyArgLysProGlyThrThrGlyAspThrIleValAsnLeuGlyLeuThrAla

 160 170 180 190 200 210
 GCGATCCTGCTGTGCTGGCTGGCCTGCACGCCCTTACGCTATGGTTGCTAGATGCGGCC
 21 AlaIleLeuLeuCysTrpLeuValLeuHisAlaPheThrLeuTrpLeuLeuAspAlaAla

 220 230 240 250 260 270
 GCGCATCCGCTGCTGCCGTGCTGTGCTGGCTGGCTGACCTGGCTGTCGGTCGGCTG
 41 AlaHisProLeuLeuAlaValLeuCysLeuAlaGlyLeuThrTrpLeuSerValGlyLeu

 280 290 300 310 320 330
 TTCATCATCGCGCATGACGCAATGCACGGGTCCGTGGTGCCGGGGCGCGCGCCAAT
 61 PheIleIleAlaHisAspAlaMetHisGlySerValValProGlyArgProArgAlaAsn

 340 350 360 370 380 390
 GCGGCGATGGGCAACTGGCGCTGTGGCTCTATGCCGGGTTCTCGTGGCCCAAGCTGATC
 81 AlaAlaIleGlyGlnLeuAlaLeuTrpLeuTyrAlaGlyPheSerTrpProLysLeuIle

 400 410 420 430 440 450
 GCCAAGCACATGACGCATCACCGGCACGCCGGCACCGACAACGATCCGATTTCGGTCAC
 101 AlaLysHisMetThrHisHisArgHisAlaGlyThrAspAsnAspProAspPheGlyHis

 460 470 480 490 500 510
 GGAGGGCCCGTGCCTGGTACGGCAGCTCGTCTCACCTATTCGGCTGGCGAGAGGGA
 121 GlyGlyProValArgTrpTyrGlySerPheValSerThrTyrPheGlyTrpArgGluGly

 520 530 540 550 560 570
 CTGCTGCTACCGGTGATCGTCACCACCTATGCGCTGATCCTGGCGATCGCTGGATGTAT
 141 LeuLeuLeuProValIleValThrThrTyrAlaLeuIleLeuGlyAspArgTrpMetTyr

 580 590 600 610 620 630
 GTCATCTTCTGGCCGGTCCGGCCTGGCGTCAACGATTTTCGTCTCGGA
 161 ValIlePheTrpProValProAlaValLeuAlaSerIleGlnIlePheValPheGlyThr

 640 650 660 670 680 690
 TGGCTGCCCAACGCCGGGACATGACGATTTCCGACCGGCACAACGCGAGGTCGACC
 181 TrpLeuProHisArgProGlyHisAspAspPheProAspArgHisAsnAlaArgSerThr

 700 710 720 730 740 750
 GGCATCGGCGACCCGTTGTCACTACTGACCTGCTTCCATTGCGGGCTATCACCA
 201 GlyIleGlyAspProLeuSerLeuLeuThrCysPheHisPheGlyGlyTyrHisHisGlu

FIG. 13

13 / 20

760 770 780 790 800 810
CATCACCTGCATCCGCATGTGCCGTGGCGCCTGCCTCGTACACGCAAGACCAGAGC
221 HisHisLeuHisProHisValProTrpTrpArgLeuProArgThrArgLysThrGlyGly

820 827
CGCGCATGA
241 ArgAla***
↑ B

FIG. 14

C↓

830	840	850	860	870	880															
ATGACGCAATTCTCATGGTGGCGACAGTCCTCGTGATGGAGCTGACCGCCTATTCC																				
1	Met	Thr	Gln	Phe	Leu	Ile	Val	Val	Ala	Thr	Val	Leu	Thr	Ala	Tyr	Ser				
890	900	910	920	930	940															
GTCCACCGCTGGATTATGCCACGGCCCCCTAGGCTGGGCTGGCACAAAGTCCCATCAGCAA																				
21	Val	His	Arg	Trp	Ile	Met	His	Gly	Pro	Leu	Gly	Trp	Gly	Trp	His	Lys	Ser	His	Glu	
950	960	970	980	990	1000															
GAGCACGACCACGCGTTGGAGAAGAACGACCTCTACGGCGTCGTCTCGCGGTGCTGGCG																				
41	Glu	His	Asp	His	Ala	Leu	Glu	Lys	Asn	Asp	Leu	Tyr	Gly	Val	Val	Phe	Ala	Val	Leu	Ala
1010	1020	1030	1040	1050	1060															
ACGATCCTCTTCACCGTGGCGCCATTGGTGGCGGTGCTGTGGATCGCCCTGGC																				
61	Thr	Ile	Leu	Phe	Thr	Val	Gly	Ala	Tyr	Trp	Trp	Pro	Val	Leu	Trp	Ile	Ala	Leu	Gly	
1070	1080	1090	1100	1110	1120															
ATGACGGTCTATGGGTTGATCTATTCTACCTGCACGGGCTTGTGCATCACGCTGG																				
81	Met	Thr	Val	Tyr	Gly	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Leu	His	Asp	Gly	Leu	Val	His	Gln	Arg	Trp
1130	1140	1150	1160	1170	1180															
CCGTTTCGGTATATTCCCGGGCGGGCTATTCCGCAGGCTCTACCAAGCTCATCGCTG																				
101	Pro	Phe	Arg	Tyr	Ile	Pro	Arg	Arg	Gly	Tyr	Phe	Arg	Arg	Leu	Tyr	Gln	Ala	His	Arg	Leu
1190	1200	1210	1220	1230	1240															
CACACACGGTCGAGGGGGCGGGACCACTGCGTCAGCTTCGGCTTCATCTATGCCACCC																				
121	His	His	Ala	Val	Glu	Gly	Arg	Asp	His	Cys	Val	Ser	Phe	Gly	Phe	Ile	Tyr	Ala	Pro	Pro
1250	1260	1270	1280	1290	1300															
GTGGACAAGCTGAAGCAGGATCTGAAGCGGTGGGTGTCCTGCGCCCCCAGGACGAGCGT																				
141	Val	Asp	Lys	Leu	Lys	Gln	Asp	Leu	Lys	Arg	Ser	Gly	Val	Leu	Arg	Pro	Gln	Asp	Glu	Arg
1312																				
CCGTCGTGA																				
161	Pro	Ser	***																	

↑ D

FIG. 15

10 20 30 40 50 60
 CTGCA GGCG GGCC GGTGG CCAAT GGTG CAAAC GGCAG GACTG GAACA GGACG GCGGG
 GACGT CCGGC CCGGG CCACC GGTTA CCAGC GTTGG CCGTC CTGAC CTTGT CCTGC CGCCC
 A
 70 80 90 110 120
 CCGGT CTAGG CTGTC GCCT ACGCA GCAGG AGTTT CCGAT GTCCG GACGG AAGCC TGGCA
 GGCCA GATCC GACAG CGGGA TGCCT CGTCC TCAAA GCCTA CAGGC CTGCC TTCGG ACCGT
 130 140 150 160 170 180
 CAACT GGCAG CACGA TCGTC AATCT CGGTC TGACC GCGGC GATCC TGCTG TGCTG GCTGG
 GTTGA CCGCT GTGCT AGCAG TTAGA GCCAG ACTGG CGGCG CTAGG ACGAC ACGAC CGACC
 190 200 210 220 230 240
 TCCTG CACGC CTTTA CGCTA TGGTT GCTAG ATGCG GCGGC GCATC CGCTG CTTGC CGTGC
 AGGAC GTGCG GAAAT GCGAT ACCAA CGATC TACGC CGGCG CGTAG GCGAC GAACG GCACG
 250 260 270 280 290 300
 TGTGC CTGGC TGGGC TGACC TGGCT GTCGG TCGGG CTGTT CATCA TCGCG CATGA CGCAA
 ACACG GACCG ACCCG ACTGG ACCGA CAGCC AGCCC GACAA GTAGT AGCGC GTACT GCGTT
 310 320 330 340 350 360
 TGCAC GGGTC CGTGG TGCGG GGGCG GCGGC GCGCC AATGC GGCAG TCGGG CAACT GGCAG
 ACGTG CCCAG GCACC ACGGC CCCGC CGGCG CGCGG TTACG CCGCT AGCCC GTTGA CGCGC
 370 380 390 400 410 420
 TGTGG CTCTA TGCAG GGTTC TCGTG GCCCA AGCTG ATCGC CAAGC ACATG ACGCA TCACC
 ACACC GAGAT ACGCC CCAAG AGCAC CGGGT TCGAC TAGCG GTTCG TGTAC TGCCT AGTGG
 430 440 450 460 470 480
 GGCAC GCCGG CACCG ACAAC GATCC CGATT TCGGT CACGG AGGGC CCGTG CGCTG GTACG
 CCGTG CGGCC GTGGC TGTG CTAGG GCTAA AGCCA GTGCC TCCCG GGCAC GCGAC CATGC
 490 500 510 520 530 540
 GCAGC TTCGT CTCCA CCTAT TTCGG CTGGC GAGAG GGACT GCTGC TACCG GTGAT CGTC
 CGTCG AAGCA GAGGT GGATA AAGCC GACCG CTCTC CCTGA CGACG ATGGC CACTA GCAGT
 550 560 570 580 590 600
 CCACC TATGC GCTGA TCCGT GGCAG TCGCT GGATG TATGT CATCT TCTGG CCGGT CCCGG
 GGTGG ATACG CGACT AGGAC CCGCT AGCGA CCTAC ATACA GTAGA AGACC GGCCA GGGCC
 610 620 630 640 650 660
 CCGTT CTGGC GTCGA TCCAG ATTTT CGTCT TCGGA ACTTG GCTGC CCCAC CGCCC GGGAC
 GGCAA GACCG CAGCT AGGTC TAAAA GCAGA AGCCT TGAAC CGACG GGGTG GCGGG CCCTG
 670 680 690 700 710 720
 ATGAC GATTT TCCCG ACCGG CACAA CGCGA GGTGG ACCGG CATCG GCGAC CCGTT GTCAC
 TACTG CTAAA AGGGC TGGCC GTGTT GCGCT CCAGC TGGCC GTAGC CGCTG GGCAA CAGTG

FIG. 16

16 / 20

730 740 750 760 770 780
 TACTG ACCTG CTTCC ATTTC GGC GG CTATC ACCAC GAACA TCACC TGCAT CCGCA TGTGC
 ATGAC TGGAC GAAGG TAAAG CCGCC GATAG TGGTG CTTGT AGTGG ACGTA GCGGT ACACG
 790 800 810 820 830 840
 CGTGG TGGCG CCTGC CTCGT ACACG CAAGA CCGGA GGCCG CGCAT GACGC AATTG CTCAT
 GCACC ACCGC GGACG GAGCA TGTGC GTTCT GGCCT CCGGC GCGTA CTGCG TTAAG GAGTA
 850 860 870 880 890 900
 TGTGG TGGCG ACAGT CCTCG TGATG GAGCT GACCG CCTAT TCCGT CCACCC GCTGG ATTAT
 ACAGC ACCGC TGTCA GGAGC ACTAC CTCGA CTGGC GGATA AGGCA GGTGG CGACC TAATA
 910 920 930 940 950 960
 GCACG GCCCC CTAGG CTGGG GCTGG CACAA GTCCC ATCAC GAAGA GCACG ACCAC GCGTT
 CGTGC CGGGG GATCC GACCC CGACC GTGTT CAGGG TAGTG CTTCT CGTGC TGGTG CGCAA
 970 980 990 1000 1010 1020
 GGAGA AGAAC GACCT CTACG GCGTC GTCTT CGCGG TGCTG GCGAC GATCC TCTTC ACCGT
 CCTCT TCTTG CTGGA GATGC CGCAG CAGAA GCGCC ACGAC CGCTG CTAGG AGAAG TGGCA
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GGGCG CCTAT TGGTG GCGGG TGCTG TGGTG GATCG CCTTG GGCAT GACGG TCTAT GGGTT
 CCCGC GGATA ACCAC CGGCC ACGAC ACCAC CTAGC GGGAC CCGTA CTGCC AGATA CCCAA
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GATCT ATTTC ATCCT GCACG ACAGG CTTGT GCATC AACGC TGGCC GTTTC GGTAT ATTCC
 CTAGA TAAAG TAGGA CGTGC TGCCC GAACA CGTAG TTGCG ACCGG CAAAG CCATA TAAGG
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GCGGC GGGGC TATTT CCGCA GGCTC TACCA AGCTC ATCGC CTGCA CCACG CGGTC GAGGG
 CGCCG CCCCC ATAAA GGGGT CCGAG ATGGT TCGAG TAGCG GACGT GGTGC GCCAG CTCCC
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GCGGG ACCAC TGCCT CAGCT TCGGC TTCAT CTATG CCCC GTGGT GGACA AGCTG AAGCA
 CGCCC TGGTG ACGCA GTCGA AGCCG AAGTA GATAC GGGGT GGGCA CCTGT TCGAC TTCGT
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 GGATC TGAAG CGGTC GGGTG TCCCT CGCCC CCAGG ACGAG CGTCC GTCGT GATCT CTGAT
 CCTAG ACTTC GCCAG CCCAC AGGAC GCGGG GGTCC TGCTC GCAGG CAGCA CTAGA GACTA
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CCCGG CGTGG CCGCA TGAAA TCCGA CGTGC TGCTG GCAGG GGCCG GCCTT GCCAA CGGAC
 GGGCC GCACC GGCCT ACTTT AGGCT GCACG ACGAC CGTCC CCGGC CGGAA CGGTT GCCTG
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 TGATC GCGCT GGC GA TCCGC AAGGC GCGGC CCGAC CTTCG CGTGC TGCTG CTGGA CCGTG
 ACTAG CGCGA CCGCT AGGCG TTCCG CGCCG GGCTG GAAGC GCACG ACGAC GACCT GGCAC

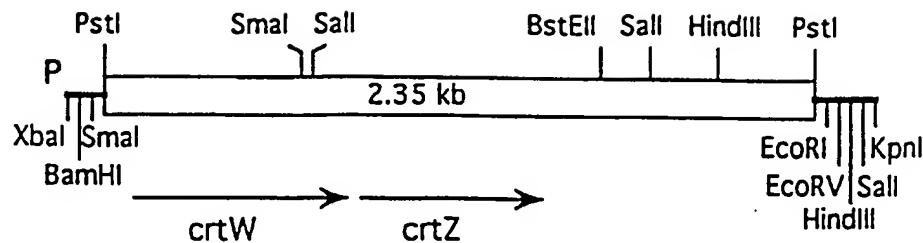
F I G. 17

17 / 20

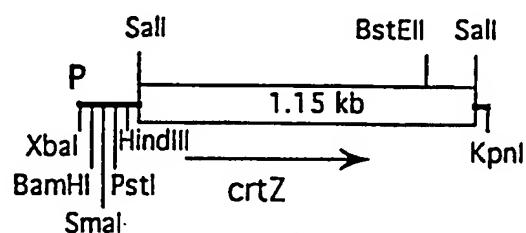
1450 1460 1470 1480 1490 1500
CGGCG GGCAC CTCGG ACGGG CATAc TTGGT CCTGC CACGA CACCG ATTTG GCGCC GCACT
GCCGC CCGCG GAGCC TGCCC GTATG AACCA GGACG GTGCT GTGGC TAAAC CGCGG CGTGA
1510 1520 1530 1540 1550 1560
GGCTG GACCG CCTGA AGCCG ATCAG GCGTG GCGAC TGGCC CGATC AGGAG GTGCG GTTCC
CCGAC CTGGC GGACT TCGGC TAGTC CGCAC CGCTG ACCGG GCTAG TCCTC CACGC CAAGG
1570 1580 1590 1600 1610 1620
CAGAC CATTC GCGAA GGCTC CGGGC CGGAT ATGGC TCGAT CGACG GGCAG GGGCT GATGC
GTCTG GTAAG CGCTT CCGAG GCCCG GCCTA TACCG AGCTA GCTGC CCGCC CCCGA CTACG
1631
GTGCG GTGAC C
CACGC CACTG G

FIG. 18

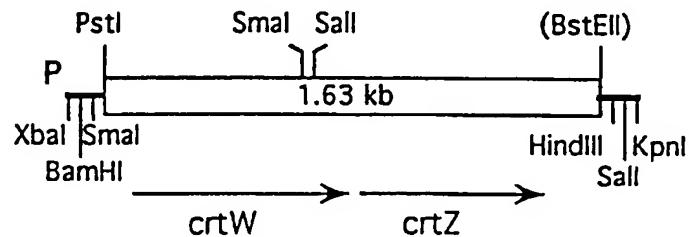
pPC11



pPC13



pPC17



pPC17-3

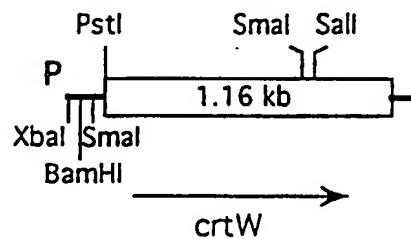


FIG. 19

19 / 20

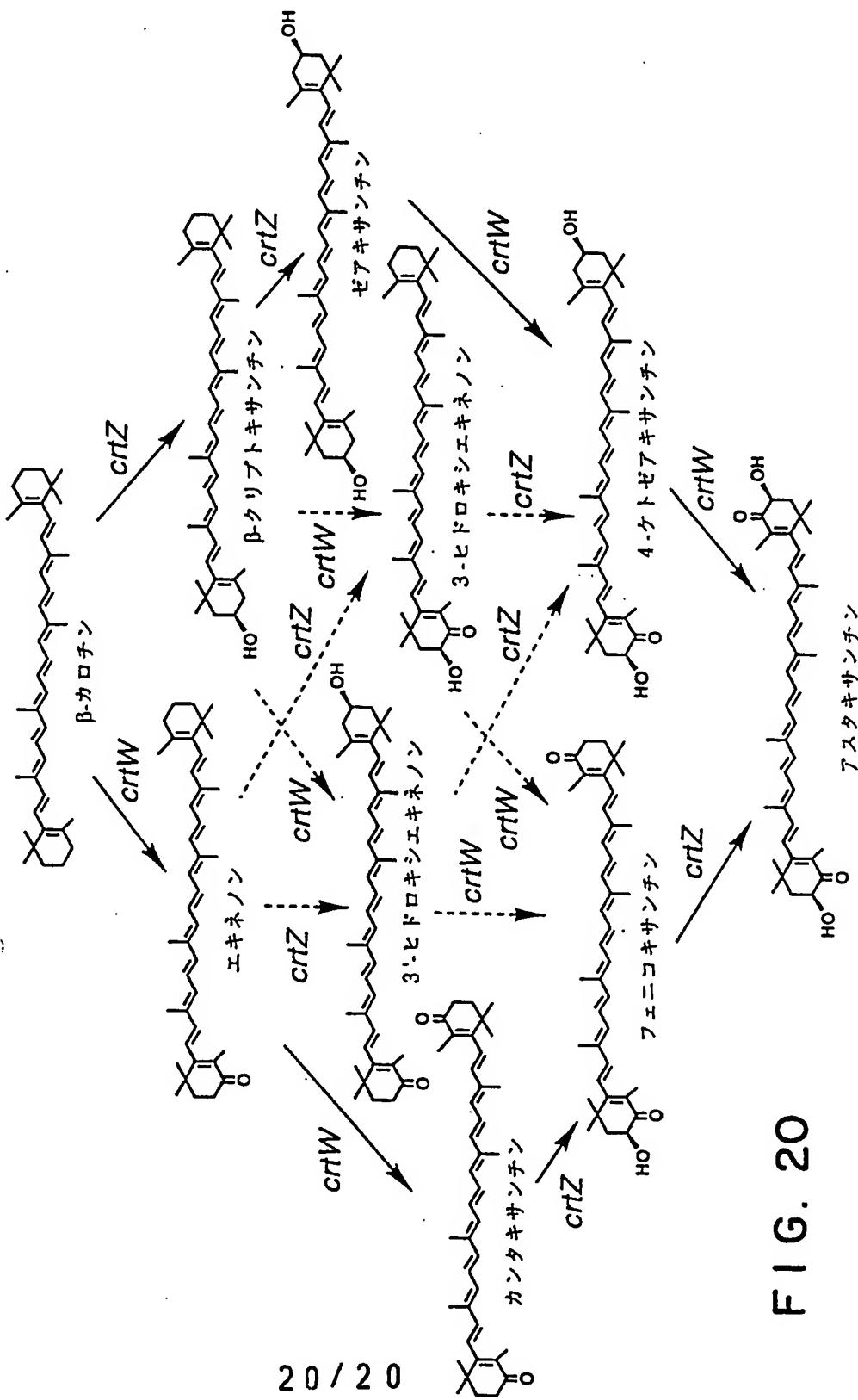


FIG. 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02220

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C16 C12N15/00, C12P7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C16 C12N15/00, C12P7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPIL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO, A, 9406918 (Gist-Brocades NV.), March 31, 1994 (31. 03. 94) &EP, A, 586751 & CA, A, 2105957	1-31
A	EP, A, 474347 (Unilever Plc, Quest Int. BV.), March 11, 1992 (11. 03. 92) & JP, A, 5-076347	1-31
A	"Marine bacteria produced astaxanthin" 10th International symposium on carotenoids, abstract, CL11-3(1993)	1-31

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

• Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
March 16, 1995 (16. 03. 95)	April 4, 1995 (04. 04. 95)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C6 C12N15/00, C12P7/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C6 C12N15/00, C12P7/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPIL

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
E	WO, A, 9406918 (Gist-Brocades NV.), 31. 3月. 1994 (31. 03. 94) & EP, A, 586751 & CA, A, 2105957	1-31
A	EP, A, 474347 (Unilever Plc, Quest Int. B.V.), 11. 3月. 1992 (11. 03. 92) & JP, A, 5-076347	1-31

 C欄の読みにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日

若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 08. 95

国際調査報告の発送日

04.04.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

種 村 慶 樹

4 B 9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C(続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	"Marine bacteria produced astaxanthin" 10th International symposium on carotenoids, abstract, CL11-3 (1993)	1-31